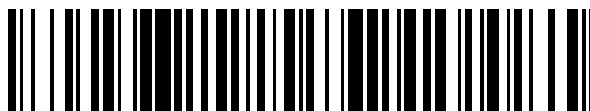


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 363**

51 Int. Cl.:

G01N 33/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2008 PCT/US2008/082038**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09059170**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08844724 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2215477**

54 Título: **Ehrlichia canis DIVA (de diferenciación entre animales infectados y vacunados)**

30 Prioridad:

31.10.2007 US 984019 P

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

19.07.2019

73 Titular/es:

**IDEXX LABORATORIES INC (100.0%)
One IDEXX Drive
Westbrook, ME 04092, US**

72 Inventor/es:

**KRAH, EUGENE, REGIS;
BEALL, MELISSA;
O'CONNOR, THOMAS, PATRICK y
CHANDRASHEKAR, RAMASWANY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 363 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

Ehrlichia canis DIVA (de diferenciación entre animales infectados y vacunados)

Las *Ehrlichia* son agentes patógenos intracelulares obligados que infectan los glóbulos blancos circulantes en anfitriones mamíferos. *Ehrlichia canis* puede infectar cánidos y seres humanos y causar erliquiosis monocítica canina (CME) y erliquiosis monocítica humana (HME), respectivamente. La enfermedad canina se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, pérdida de peso y pancitopenia. En los seres humanos, la enfermedad se caracteriza por fiebre, cefalea, mialgia y leucopenia. La detección temprana y el tratamiento son importantes para el tratamiento de la erliquiosis canina y humana. En este contexto, los documentos US 2006/0234322 A1 y WO 2008/04300 A2 describen antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden utilizar para diferenciar animales infectados por *E. canis* de animales que han sido sensibilizados con *E. canis*, así como composiciones y métodos para determinar la presencia de antígenos y anticuerpos de *E. canis*.

Una realización de la invención proporciona un método para determinar la presencia de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo que son específicos para *E. canis*, en una muestra de prueba. El método comprende:

- (a) poner en contacto la muestra de prueba con uno o más polipéptidos purificados que consisten en SEQ ID NO: 33, en donde los uno o más polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*, en condiciones adecuadas para la unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y
- (b) detectar la presencia de unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

La presencia de unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno indica la presencia de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos específicos para *E. canis* en la muestra de prueba. Los uno o más polipéptidos purificados se pueden unir a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoacídico, un conector aminoacídico, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una combinación de los mismos. El método puede comprender adicionalmente la detección de la cantidad de unión específica. Los uno o más polipéptidos purificados se pueden inmovilizar en un soporte sólido.

Otra realización de la invención proporciona una composición que comprende uno o más polipéptidos purificados que consisten en SEQ ID NO: 33.

- (c) SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 1 está ausente o es C, la X en la posición 4 es H o Q, la X en la posición 25 es D o G, y la X en la posición 36 es E o G;
- (d) los aminoácidos 1-27 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 1 es C o está ausente, la X en la posición 4 es H o Q, la X en la posición 25 es D o G;
- (e) los aminoácidos 13-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G; y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (f) los aminoácidos 24-49 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (g) los aminoácidos 13-27 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (h) los aminoácidos 24-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal; o
- (i) combinaciones de (a) - (h).

Los uno o más polipéptidos purificados pueden estar en forma multimérica. Los uno o más polipéptidos purificados pueden estar unidos a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoacídico, un conector 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.

Otra realización más de la invención proporciona un método para controlar el tratamiento de una infección por *E. canis* en un paciente que comprende: (a) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una primera muestra de un paciente antes o en las primeras fases de un tratamiento para una infección por *E. canis* mediante el método de la reivindicación 4; (b) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una segunda muestra del paciente después de efectuar el tratamiento mediante el método de la reivindicación 4; y (c) comparar la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* en la primera muestra con la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* en la segunda muestra para evaluar un cambio y de ese modo controlar el tratamiento.

La invención se puede utilizar en relación con un método para distinguir entre animales que han sido (a) infectados con *Ehrlichia canis*; y (b) animales que no han sido infectados por *E. canis* independientemente de si el animal ha sido vacunado contra *E. canis*. El método comprende

- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más de los primeros polipéptidos purificados que no se unen específicamente a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*; en donde los uno o más primeros polipéptidos purificados tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 22-33 y en donde los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*; y
- 10 (b) detectar si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados.

Si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados, en ese caso el animal está infectado con *E. canis*. Los uno o más primeros polipéptidos purificados pueden tener una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos. Los uno o más primeros polipéptidos purificados se pueden unir a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoácido, un conector aminoácido, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos. El método puede comprender adicionalmente la determinación de si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados que son un elemento de una vacuna de *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal ha sido infectado con *E. canis* y el estado de vacunación contra *E. canis* es desconocido. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal no ha sido infectado con *E. canis* y ha sido vacunado contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos purificados, en ese caso el animal no ha sido vacunado contra *E. canis* y no ha sido infectado por *E. canis*.

Adicionalmente, la invención se puede utilizar en relación con un método para determinar el estado de vacunación e infección de un animal para *E. canis*. El método comprende:

- 30 (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más primeros polipéptidos purificados que no se unen específicamente a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*, en donde los uno o más primeros polipéptidos purificados tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 22-33 y en donde los uno o más primeros polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*, y uno o más segundos polipéptidos purificados que se unen específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*; y
- 35 (b) detectar si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados y a los uno o más segundos polipéptidos purificados.

40 Si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal ha sido infectado con *E. canis* y el estado de vacunación para *E. canis* es desconocido. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal no ha sido infectado con *E. canis* y ha sido vacunado contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos purificados, en ese caso el animal no ha sido vacunado contra *E. canis* y no ha sido infectado por *E. canis*. Los uno o más primeros polipéptidos purificados pueden tener una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos. Los uno o más primeros polipéptidos purificados se pueden unir a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoácido, un conector aminoácido, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.

Además, la invención se puede utilizar en relación con un método para generar una respuesta inmunitaria en un animal que comprende administrar uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 22-33 o una combinación de los mismos al animal, en donde los uno o más polipéptidos purificados generan una respuesta inmunitaria en el animal. Los uno o más polipéptidos purificados pueden tener una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos. Los uno o más polipéptidos purificados pueden estar en forma multimérica. Los uno o más polipéptidos purificados se pueden unir a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoácido, un conector aminoácido, una secuencia señal, una secuencia de

transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínass o una combinación de los mismos.

Por otra parte, la invención se puede utilizar en relación con un método para la profilaxis, tratamiento o mejora de una infección por *Ehrlichia canis* en un animal que comprende administrar al animal:

- 5 (a) uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 22-33, o una combinación de los mismos; o
- (b) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos purificados que comprenden SEQ ID NO: 22-33, o una combinación de los mismos; o
- 10 (c) uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos purificados que comprenden SEQ ID NO: 22-33, o una combinación de los mismos;

por medio de lo cual la infección por *E. canis* se previene, se mejora o se trata.

15 La Figura 1 muestra la evaluación del Ensayo SNAP® 3Dx® 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. La mancha positiva para *E. canis* se volvió positiva en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

La Figura 2 muestra un gel de proteínas de *E. canis* separadas 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* que utilizan sueros de perro recogidos el día 0. La dilución del plasma es 1:100. Estos perros dieron negativo para la reactividad con los antígenos de *E. canis*.

20 La Figura 4 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* que utilizan sueros de perros de un grupo de cuatro animales vacunados. 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 un grupo de animales infectados. La dilución de los sueros es 1:1.000.

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

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

35 La Figura 8 demuestra la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* utilizando un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 23 en perros durante el curso temporal que incluye infección, tratamiento y recuperación.

Las Figuras 9A-B demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* utilizando un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 10 en dos perros que no han sido vacunados contra *E. canis* a lo largo del curso temporal de la infección.

40 Las Figuras 10A-C demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* utilizando un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 10 en tres perros que han sido vacunados (coadyuvante RIBI) contra *E. canis* a lo largo del curso temporal de la infección.

Las Figuras 11A-C demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* utilizando un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 10 en tres perros que han sido vacunados (coadyuvante RIBI + BCG) contra *E. canis* a lo largo del curso temporal de la infección.

45 Descripción detallada de la invención

50 Se han descrito antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden utilizar para diferenciar los animales infectados naturalmente por *E. canis* de los animales que han sido vacunados contra *E. canis*. "Vacunados" significa la administración de una composición de vacuna que puede prevenir o mejorar los efectos de la infección por un patógeno al establecer o mejorar la inmunidad hacia el patógeno. Las composiciones de vacunas pueden comprender patógenos muertos, inactivados o atenuados o productos purificados o porciones de los patógenos. La vacunación no es necesariamente 100% eficaz.

Antes de describir con detalle la presente invención, se definirán varios términos. Como se emplean en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 Como se emplea 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", como se emplea en la presente memoria, por lo tanto, se refiere 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. El término "polipéptidos" puede referirse a uno o más de un tipo de polipéptidos (un conjunto de polipéptidos). "Polipéptidos" también se puede referir a mezclas de dos o más tipos diferentes de polipéptidos (una mezcla de polipéptidos). Los términos "polipéptidos" o "polipéptido" también pueden significar cada uno "uno o más polipéptidos".

15 Los polipéptidos de la invención pueden estar "aislados". Un polipéptido aislado es un polipéptido que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias de aminoácidos flanqueantes amino y carboxi con las que está naturalmente asociado. En particular, "un polipéptido aislado mostrado en SEQ ID NO: 22-33" significa que el polipéptido no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias de aminoácidos flanqueantes amino y carboxi con las que está naturalmente asociado (donde el polipéptido es un polipéptido de origen natural) en una molécula de proteína de *E. canis*.

20 Como se emplea en la presente memoria, "antígeno" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula contra la cual un sujeto puede iniciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula biológica que incluya, por ejemplo, metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como los carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En las composiciones y métodos de la invención, un antígeno puede ser un polipéptido, p. ej., uno que comprenda al menos aproximadamente seis o más aminoácidos.

25 Como se emplea 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 se ha purificado, modificado o alterado. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a: sustituciones, modificaciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; alteraciones en el patrón de lipidación, glicosilación o fosforilación; reacciones de grupos laterales amino, carboxilo o hidroxilo libres de los residuos de aminoácido presentes en el polipéptido con otras moléculas orgánicas y no orgánicas; y otras modificaciones, cualquiera de las cuales puede dar como resultado cambios en la estructura primaria, secundaria o terciaria.

30 Una "muestra biológica" es cualquier muestra de un animal que se espera que contenga inmunoglobulinas. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser plasma, sangre, suero, saliva, orina, heces, exudado de heridas, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen, esputo, así como extractos de tejidos y extractos de células. En una realización de la invención, se puede obtener una muestra de prueba de un animal tal como un caballo, perro, vaca, llama, oveja, cabra, ciervo, alce, roedor o cualquier otro animal. Un ser humano es considerado un animal en la presente memoria. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra o animales que son aplicables a la presente invención.

35 Una "infección", tal como en una infección por *E. canis*, significa que un animal ha sido 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* a través de la vacunación.

40 Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna contra *E. canis*" es cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no está presente en una determinada vacuna o vacunas contra *E. canis*. Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna contra *E. canis*" es también cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no es una porción inmunogénicamente activa de una vacuna contra *E. canis*. Es decir, el polipéptido o antígeno pueden estar presentes en la vacuna, pero no se genera una respuesta inmunitaria contra el polipéptido o antígeno (p. ej., la generación de anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido o antígeno) en respuesta a la administración de la vacuna contra *E. canis*. Los elementos de las vacunas pueden ser partes de una vacuna de subunidades que incluye menos que la bacteria completa; estas porciones se pueden sintetizar químicamente o se pueden expresar de forma recombinante antes de formar parte de la vacuna, y estas porciones pueden estar codificadas por uno o más vectores que expresan una composición inmunogénica *in vivo*.

45 Un "anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna contra *E. canis*" se refiere a un anticuerpo que se obtiene como resultado de una vacunación con una vacuna contra *E. canis*. Estos anticuerpos pueden ser idénticos o similares a los anticuerpos provocados como resultado de una infección por *E. canis* natural. Estos anticuerpos se mantendrán a un título suficiente y para proporcionar un efecto protector y neutralizante contra las bacterias. Una vacunación satisfactoria produce un nivel medible del anticuerpo (o anticuerpos)

que es provocado por un componente de la vacuna contra *E. canis*. Los ejemplos de antígenos de *E. canis* que producen anticuerpos que pueden ser un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna contra *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 Estados Unidos Núm. 6660269; 6.458.942; 6.403.780; 6.392.023), proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa (véase, la Publicación de Patente de Estados Unidos 20040170972), p43 (véase, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.355.777), que es la porción N-terminal de p153, una glicoproteína (véase, la Publicación de Patente de Estados Unidos 2004/0121433), p153, y p30-1, p30-2, p30-3, p30-4, p30-5, p30-6, p30-7, p30-8, p30-9, p30-10, p30-11, p30-12, p30-13, p30-14, p30-15, p30-16, p30-17, p30-18, p30-19, p30-20 (Ohashi et al. 2001, *Infection and Immunity* 69 (4): 2083-91).

Una respuesta inmunitaria consiste en el desarrollo en un organismo de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos contra un antígeno tal como un polipéptido. Generalmente, una respuesta de este tipo incluye, pero no se limita a, una o más de las siguientes: producción de anticuerpos, células B, células T coadyuvantes, células T supresoras y/o células T citotóxicas. Se puede detectar una respuesta inmunitaria utilizando cualquiera de los diversos ensayos conocidos por los expertos en la técnica.

Polipéptidos de la invención

Las muestras biológicas de animales que han sido vacunados contra *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, se describe en la presente memoria un método para distinguir entre animales que han sido infectados por *E. canis* y aquellos que no han sido infectados por *E. canis*, independientemente de si el animal ha sido vacunado 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 determinada vacuna contra *E. canis*, pero que eso se une específicamente a un anticuerpo que se genera en respuesta a la infección por *E. canis*.

El desarrollo de anticuerpos contra *E. canis* en un animal frente a una vacuna depende de la vacuna particular utilizada para vacunar al animal. La diferencia en la respuesta inmunitaria entre animales vacunados contra *E. canis* y animales que están infectados natural o experimentalmente con *E. canis* proporciona un medio para determinar si un animal está infectado natural o experimentalmente con *E. canis*, independientemente de si el animal ha sido vacunado contra *E. canis*. Por lo tanto, utilizando los métodos anteriores, los animales que han sido infectados por *E. canis* se pueden distinguir de los animales que no han sido infectados por *E. canis* y/o han sido vacunados contra *E. canis*. Los antígenos de la invención, sus regiones inmunodominantes y sus epítomos se pueden utilizar en dichos métodos. Estas composiciones pueden ser referidas como Antígenos DIVA de *E. canis* (de Diferenciación entre Animales Infectados y Vacunados). 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 contra *E. canis* particular.

Por consiguiente, la detección de la unión específica 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 en particular puede indicar una infección por *E. canis* natural o experimental. La ausencia de semejante unión puede indicar la ausencia de infección por *E. canis*. 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 de un animal a una determinada vacuna contra *E. canis*, se puede utilizar para detectar anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación (en la presente memoria se denomina "un antígeno de vacuna contra *E. canis*"). El antígeno de la vacuna contra *E. canis* no solo se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna contra *E. canis* determinada, sino que también se puede unir específicamente a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a la infección por *E. canis*. Si se detecta un anticuerpo específico para un antígeno de vacuna contra *E. canis*, el animal ha sido vacunado y/o infectado. La detección de ninguno de los anticuerpos indica que no hay infección y no hay vacunación. Como tales, varias combinaciones de reactivos de captura separados pueden llevar a una determinación del estado de vacunación y/o de infección del sujeto de prueba.

En un aspecto, un método incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que es parte de la bacteria *E. canis*, pero no es un elemento de una determinada vacuna contra *E. canis*. En otro aspecto, un método incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que está presente en o es parte de la bacteria *E. canis* y una vacuna contra *E. canis*, en donde se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno (p. ej., la generación de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno) en respuesta a la infección con la bacteria *E. canis*, pero no en respuesta a la administración de la vacuna contra *E. canis*. En otro aspecto, se analiza una muestra biológica de un animal 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 un antígeno de vacuna contra *E. canis*. A continuación se determina que el animal no ha sido infectado y no ha sido vacunado al determinar la ausencia de tales anticuerpos.

En un aspecto, un antígeno DIVA no es un elemento de una vacuna contra *E. canis*. En otro aspecto, un antígeno DIVA es parte de una vacuna contra *E. canis*, pero no se genera una respuesta inmunitaria (p. ej., la generación de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno DIVA) en respuesta a la administración de la vacuna contra *E. canis*. El estado de vacunación o infección de un animal se puede determinar detectando si los anticuerpos de la

muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más antígenos DIVA. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna y se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal está infectado con *E. canis* y el estado de vacunación del animal es desconocido. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal está vacunado contra *E. canis* y no está infectado por *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal no está infectado con *E. canis* y no está vacunado contra *E. canis*.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para distinguir entre animales que han sido (a) infectados por *Ehrlichia canis*; y (b) animales que no han sido infectados por *E. canis* independientemente de su estado de vacunación contra *E. canis*. El método comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con un primer polipéptido de *E. canis* purificado que no se une sustancialmente de manera específica a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*; en donde el primer polipéptido de *E. canis* purificado comprende SEQ ID NO: 22-33 o combinaciones de los mismos y detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente al primer polipéptido de *E. canis* purificado. Si los anticuerpos de la muestra se unen sustancialmente de manera específica al primer polipéptido de *E. canis* purificado, en ese caso el animal está infectado por *E. canis*; y si los anticuerpos de la muestra no se unen sustancialmente de manera específica al primer polipéptido de *E. canis* purificado, en ese caso el animal no está infectado por *E. canis*.

El método puede comprender adicionalmente la determinación de si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a un segundo polipéptido de *E. canis* purificado que comprende un antígeno de vacuna contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal está infectado por *E. canis* y el estado de vacunación del animal es desconocido. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal está vacunado contra *E. canis* y no está infectado por *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a uno o más de los antígenos de vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, en ese caso el animal no está infectado por *E. canis* y no está vacunado contra *E. canis*. En una realización, los anticuerpos de las muestras de prueba no se unen sustancialmente de manera específica a antígenos DIVA y/o antígenos de vacuna contra *E. canis*. Sustancialmente, la unión no específica es una cantidad de unión que un experto en la técnica consideraría un resultado negativo.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar el estado de vacunación e infección de un animal con *E. canis*. El método comprende:

- (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con un primer polipéptido purificado que no se une sustancialmente de manera específica a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*, en donde el primer polipéptido purificado comprende SEQ ID NO: 22-33 o combinaciones de los mismos, y un segundo polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*;
- (b) detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente al primer y segundo polipéptidos purificados;

en donde si los anticuerpos de la muestra biológica se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal ha sido infectado por *E. canis* y el estado de vacunación para *E. canis* es desconocido; en donde si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el animal no ha sido infectado por *E. canis* y ha sido vacunado contra *E. canis*; y en donde si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos purificados, en ese caso el animal no ha sido vacunado contra *E. canis* y no ha sido infectado por *E. canis*.

La Tabla 1 muestra la infección y/o el estado de vacunación de los animales que se pueden determinar con antígenos DIVA de *E. canis* y antígenos de vacuna contra *E. canis*. "No realizado" en la Tabla 1 significa que una prueba en particular no se completó y, por lo tanto, no hay resultados disponibles. Por ejemplo, si una muestra biológica de un animal se somete a prueba con un antígeno DIVA de *E. canis* y el resultado es positivo y no se completa ninguna prueba con un antígeno de vacuna contra *E. canis*, en ese caso el estado del animal sería infectado, pero se desconocería el estado de vacunación.

Tabla 1

Infección/estado de vacunación del animal	Resultado con Antígeno DIVA de <i>E. canis</i>	Resultado con antígeno de vacuna contra <i>E. canis</i> *
Infectado, estado de vacunación desconocido.	Positivo	No realizado
Infectado, estado de vacunación desconocido.	Positivo	Positivo
Vacunado, no infectado	Negativo	Positivo
Vacunado y/o infectado	No realizado	Positivo
No infectado, no vacunado	Negativo	Negativo
No infectado, estado de vacunación desconocido	Negativo	No realizado
No vacunado, no infectado	No realizado	Negativo

* Un antígeno de vacuna contra *E. canis* se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una determinada vacuna contra *E. canis*. Un antígeno de vacuna contra *E. canis* no solamente se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una determinada vacuna contra *E. canis*, sino que también se puede unir a anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a la infección por *E. canis*.

5 Un primer aspecto de la invención proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en una muestra de prueba, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a un polipéptido purificado que consiste en SEQ ID NO: 33. El método comprende poner en contacto la muestra de prueba con un polipéptido purificado que consiste en SEQ ID NO: 33 en condiciones adecuadas para la unión específica del polipéptido purificado al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y detectar la presencia o ausencia de unión específica. La presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y la ausencia de unión específica indica la ausencia de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 Las vacunas pueden no ser completamente eficaces para prevenir o mejorar una infección. Por lo tanto, es deseable tener un método para determinar si un animal vacunado se ha infectado a pesar de la vacunación. SEQ ID NO: 10, 22-33 no detectan anticuerpos anti-*E. canis* en perros que han sido vacunados contra *E. canis* y que no están infectados por *E. canis*. Se pueden utilizar SEQ ID NO: 10, 22-33 para detectar la infección por *E. canis* en perros que han recibido o no han recibido una vacuna contra *E. canis*. En una realización de la invención, el animal se infecta con *E. canis* después de recibir una vacuna contra *E. canis* y la detección de *E. canis* sigue siendo posible.

15 Otro aspecto de la invención comprende una composición que consiste en uno o más polipéptidos purificados que comprenden o que consisten en SEQ ID NO: 33. Un polipéptido de la invención se puede modificar después de la traducción. Un polipéptido purificado es una preparación de polipéptidos 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 polipéptidos que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido, etc. 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. Un polipéptido purificado no incluye extractos celulares no purificados o semipurificados o mezclas de polipéptidos que tienen una pureza inferior a 70%.

20 Una realización de la invención proporciona un polipéptido purificado que consiste en SEQ ID NO: 33. Los aminoácidos de *Ehrlichia canis* de origen natural son cualquier polipéptido producido naturalmente por un organismo de *Ehrlichia canis*.

25 El hecho de que el polipéptido SEQ ID NO: 33 sea más pequeño que un polipéptido de *Ehrlichia canis* completo es importante porque los polipéptidos más pequeños pueden tener mayor especificidad y/o sensibilidad que los polipéptidos completos en los ensayos de detección. Adicionalmente, estos polipéptidos más pequeños pueden ser menos costosos de fabricar y se pueden obtener con mayor pureza que el polipéptido completo.

30 Los polipéptidos variantes son al menos 95, 96, 97, 98, 99% o más idénticos a la secuencia de polipéptidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y también son polipéptidos descritos en la presente memoria. Los polipéptidos variantes tienen una o más variaciones conservativas de aminoácidos u otras modificaciones menores y conservan la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene una función sustancialmente equivalente cuando se compara con el polipéptido de tipo salvaje correspondiente. En una realización,

un polipéptido tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos.

Estos polipéptidos pueden tener residuos de aminoácidos adicionales más allá de los de SEQ ID NO: 33. Es decir, los polipéptidos pueden tener residuos de aminoácidos adicionales añadidos en el extremo 5' o 3' de los polipéptidos, mientras que la identidad de secuencia a lo largo de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 48 aminoácidos contiguos (dependiendo de la longitud de SEQ ID específico) de SEQ ID NO: 33 es de al menos aproximadamente 95%. No se considera que los aminoácidos adicionales añadidos en el extremo 5' o 3' de los polipéptidos afecten al porcentaje de identidad de secuencia. Los aminoácidos adicionales pueden ser aquellos de origen natural o pueden ser aminoácidos no naturales. Los polipéptidos pueden tener una longitud de 15 a 50 aminoácidos.

10 Los polipéptidos variantes tienen una o más sustituciones, deleciones, adiciones conservativas de aminoácidos u otras modificaciones menores y conservan la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene una función sustancialmente equivalente cuando se compara con el polipéptido de tipo salvaje correspondiente.

15 El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y existen varios 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
20 alineamiento de polinucleótidos o polipéptidos se codifican 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, se puede utilizar el programa
25 informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco 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 particular es, por ejemplo, aproximadamente 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total del polinucleótido o polipéptido
30 de referencia y que se permiten huecos en la identidad de hasta 5% del número total de nucleótidos o aminoácidos en el polinucleótido de referencia.

Los polipéptidos variantes se pueden identificar generalmente modificando una de las secuencias polipeptídicas de la invención, 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 de la invención en un ensayo
35 tal como un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoenzimático o un ensayo de transferencia Western, p. ej. tiene 90-110% de la actividad del polipéptido original. En una realización, el ensayo es un ensayo competitivo en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido de la invención a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente en aproximadamente 80, 95, 99 o 100%. Un anticuerpo que se une específicamente a un
40 polipéptido de tipo salvaje correspondiente también se une específicamente al polipéptido variante.

Una sustitución conservativa es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantuvieran 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 de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia señal (o líder) que dirige la transferencia de la proteína de forma co-traduccional o post-traduccional. El polipéptido también puede comprender un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o 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 se puede unir de forma covalente o no covalente a una secuencia de aminoácidos a la que el polipéptido normalmente no está asociado en la naturaleza, es decir, una secuencia de aminoácidos heteróloga. Una secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser de un organismo distinto de *E. canis*, una secuencia sintética, o una secuencia de *E. canis* no localizada en el extremo carboxi o amino de un polipéptido de la invención en la naturaleza. Además, un polipéptido se puede unir de forma covalente o no covalente a compuestos o moléculas distintos de los aminoácidos, tales como los reactivos indicadores. Un polipéptido se puede unir covalentemente o no covalentemente a un reactivo indicador, un espaciador aminoacídico, un conector aminoacídico, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una combinación de los mismos. Un polipéptido también se puede unir a radical (es decir, un grupo funcional que puede ser un

- polipéptido u otro compuesto) que mejora una respuesta inmunitaria (p. ej., citoquinas tales como la IL-2), un radical que facilita la purificación (p. ej., etiquetas de afinidad tales como una etiqueta de seis histidinas, trpE, glutatona, proteína de unión a maltosa), o un radical que facilita la estabilidad del polipéptido (p. ej., polietilenglicol; grupos protectores del extremo amino tales como acetilo, propilo, succinilo, bencilo, benciloxicarbonilo o t-butiloxicarbonilo; grupos protectores del extremo carboxilo tales como amida, metilamida y etilamida). En una realización de la invención, un ligando de purificación de proteínas puede ser uno o más residuos de aminoácidos C, por ejemplo, en el extremo amino o el extremo carboxi o ambos extremos de un polipéptido de la invención. Un espaciador aminoacídico es una secuencia de aminoácidos que no están asociados con un polipéptido de la invención en la naturaleza. Un espaciador aminoacídico puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100 o 1.000 aminoácidos.
- Si se desea, un polipéptido de la invención puede ser parte de una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como conectores aminoacídicos, espaciadores aminoacídicos, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada TMR, dominios transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como la glutatión-S-transferasa, la etiqueta de histidina y la proteína A de *Estafilococo*, o combinaciones de los mismos. Más de un polipéptido de la invención puede estar presente en una proteína de fusión. Los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una proteína de fusión de la invención. Un polipéptido de la invención puede estar unido operablemente a proteínas que no son de *Ehrlichia canis* o a proteínas p16 que no son de *Ehrlichia canis* para formar proteínas de fusión. Una proteína de fusión de la invención puede comprender uno o más polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o fragmentos de los mismos, o combinaciones de los mismos. Una proteína de fusión no se produce en la naturaleza. El término "unido operablemente" significa que el polipéptido de la invención y los otros polipéptidos se fusionan en marco entre sí con el extremo N o el extremo C del polipéptido de la invención.
- Los polipéptidos de la invención pueden estar en forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o una combinación de los mismos. Un polipéptido multimérico puede ser un péptido antigénico múltiple (MAP). Véase, p. ej., Tam, J. Immunol. Methods, 196: 17-32 (1996).
- Los polipéptidos de la invención pueden comprender un antígeno que es reconocido por un anticuerpo específico para *E. canis*. El antígeno puede comprender uno o más epítopos (es decir, determinantes antigénicos). Un epítipo puede ser un epítipo lineal, un epítipo secuencial o un epítipo conformacional. Los epítopos dentro de un polipéptido de la invención se pueden identificar por varios métodos. Véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.554.101; Jameson & Wolf, CABIOS 4:181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede aislar y escrutar. Se puede preparar una serie de péptidos cortos, que en conjunto abarcan una secuencia polipeptídica completa, mediante escisión proteolítica. Comenzando, por ejemplo, con fragmentos de polipéptidos de 30 unidades (o fragmentos más pequeños), cada fragmento se puede someter a prueba para detectar la presencia de epítopos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un ensayo ELISA un polipéptido de *E. canis*, tal como un fragmento de polipéptido de 30 unidades, está anclado a un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de plástico de múltiples pocillos. 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 eliminan por lavado. La unión del anticuerpo se detecta, por ejemplo, mediante una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. A continuación se pueden someter a prueba fragmentos progresivamente más pequeños y superpuestos de un polipéptido de 30 unidades identificado para mapear el epítipo de interés.
- En una realización de la invención, un antígeno DIVA comprende un epítipo o región inmunodominante. Es decir, un epítipo o región que con mayor frecuencia provoca y se une a anticuerpos en una población del mismo cuando se compara con otros epítopos. Un antígeno puede tener uno o más epítopos inmunodominantes. Los epítopos inmunodominantes se pueden mapear, por ejemplo, en un polipéptido, después de que el polipéptido se haya administrado a un animal o antes de dicha administración. Véase, p. ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos 2004/0209324.
- Un polipéptido de la invención se puede producir de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención se puede introducir en un vector de expresión recombinante, que se puede expresar en un sistema de células anfitrionas de expresión adecuado utilizando mecanismos bien conocidas en la técnica. Una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos está disponible en la técnica y se puede utilizar cualquier sistema de expresión de este tipo. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido se puede traducir en un sistema de traducción libre de células. Un polipéptido también puede ser sintetizado químicamente u obtenido a partir de células de *E. canis*.
- Un polipéptido inmunogénico descrito en la presente memoria puede comprender una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 o fragmentos de la misma. Un polipéptido inmunogénico puede provocar anticuerpos u otras respuestas inmunitarias (p. ej., respuestas de células T del sistema inmunitario) que reconocen epítopos de un polipéptido con SEQ ID NO: 33. Un polipéptido inmunogénico descrito en la presente memoria también puede ser un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33. Un fragmento de polipéptido inmunogénico puede tener aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, o 15 (o cualquier intervalo entre 50 y 15) aminoácidos de longitud. Un fragmento de polipéptido inmunogénico puede

tener más de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 35 o 40 aminoácidos de longitud (o cualquier intervalo entre 15 y 50 aminoácidos).

Los anticuerpos específicos para *E. canis* se pueden detectar en fluidos o tejidos biológicos por cualquier método conocido en la técnica utilizando los polipéptidos de la invención. Los métodos más simples generalmente son los métodos de inmunoensayo. Uno de estos métodos es un método basado en la competencia en donde las muestras de suero se preincuban con un antígeno de *E. canis* que no es un elemento de una *vacuna contra E. canis* p. ej., un antígeno DIVA de *E. canis*) y después se añade 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 evitarán 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 añadiendo un segundo compañero de unión para el antígeno de *E. canis*, directamente marcado o capaz de ser marcado a través de la unión a otro compañero de unión que tenga una marca. Una muestra positiva, es decir una muestra que tiene anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* se asocia con una disminución de la señal de la marca.

En una realización particular, los anticuerpos contra un antígeno DIVA de *E. canis* en una muestra biológica se pueden detectar al poner en contacto la muestra con un antígeno DIVA de *E. canis* y añadir la muestra a la placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno DIVA. La unión del antígeno DIVA a la placa de microtitulación se puede detectar añadiendo un anticuerpo policlonal de conejo contra el antígeno DIVA y añadiendo un anticuerpo policlonal anti-conejo de burro conjugado con HRP. Los anticuerpos de la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA al anticuerpo inmovilizado, lo que causará una disminución en la señal.

Otro método para detectar anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* es un ensayo sándwich en el que una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se pone en contacto con un antígeno DIVA de *E. canis* inmovilizado 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 contra *E. canis*, tal como un segundo anticuerpo.

En un aspecto de la invención, 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 cual se unen los anticuerpos anti-*E. canis*, si tales 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 igual o similar a la que se utiliza para capturar anticuerpos anti-*E. canis* (si están presentes). En una realización particular, los anticuerpos contra *E. canis* se pueden detectar inmovilizando 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 separación 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 de la invención también pueden comprender mimitopos de antígenos DIVA de la invención. Un mimitopo es un epítipo peptídico aleatorio que imita a un epítipo antigénico natural durante la presentación del epítipo. Los epítipos peptídicos aleatorios se pueden identificar generando o seleccionando una biblioteca de epítipos peptídicos aleatorios. La biblioteca se pone en contacto con un anticuerpo. Se identifican los mimitopos que son específicamente inmunorreactivos con el anticuerpo. Las bibliotecas de péptidos aleatorios se pueden mostrar, por ejemplo, en fagos o se pueden generar como bibliotecas combinatorias.

Los antígenos DIVA de *E. canis*, p. ej., los polipéptidos, pueden ser naturales, es decir, aislados de una fuente natural, o puede ser sintéticos (es decir, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante utilizando mecanismos de ingeniería genética). Las proteínas naturales se pueden aislar de la bacteria completa mediante técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad. Se pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales para preparar una columna de afinidad adecuada mediante técnicas bien conocidas.

Las proteínas que presentan reacción inmunológicamente cruzada con una proteína de *E. canis* natural se pueden sintetizar químicamente. Por ejemplo, los polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más usualmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y típicamente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, se pueden sintetizar mediante el bien conocido método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena en crecimiento. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156). También se pueden utilizar proteínas recombinantes. Estas proteínas se pueden producir por 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, en sí misma, natural o sintética, con genes naturales obtenibles de la bacteria aislada mediante técnicas convencionales.

55 **Polinucleótidos de *E. canis***

Los polinucleótidos de la invención contienen menos de un genoma microbiano completo y pueden ser ácidos nucleicos de hebra sencilla o doble. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos se pueden purificar sin 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%. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o secciones de gel que contienen un producto de ADN genómico digerido con enzimas de restricción no se debe considerar un polinucleótido aislado. Los polinucleótidos de la invención codifican los polipéptidos de la invención descritos anteriormente. En una realización de la invención, los polinucleótidos codifican polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, fragmentos de los mismos, o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos de la invención pueden consistir en menos de aproximadamente 200, 120, 100, 90, 75, 60, 57, 54, 45 (o cualquier intervalo entre 200 y 45) polinucleótidos de *Ehrlichia canis* de origen natural, contiguos. Los polinucleótidos de la invención pueden consistir en más de aproximadamente 45, 54, 57, 60, 75, 90, 100, 120, 150, 200, (o cualquier intervalo entre 45 y 200), o más polinucleótidos *Ehrlichia canis* de origen natural, contiguos. Los polinucleótidos purificados pueden comprender nucleótidos heterólogos adicionales (es decir, nucleótidos que no son de *Ehrlichia canis*) e incluso aminoácidos de *Ehrlichia canis* adicionales, siempre y cuando no se produzcan de forma contigua de manera natural con los polinucleótidos de p16 de *Ehrlichia canis* u otros polinucleótidos de la invención. Los polinucleótidos de la invención 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 de la invención se pueden aislar. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido natural que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas flanqueantes 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 que se encuentran de forma natural flanqueando inmediatamente la molécula de ADN recombinante en un genoma natural se hayan eliminado o estén ausentes. Los polinucleótidos aislados también incluyen moléculas de ácido nucleico de origen no natural. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro, por ejemplo, de bibliotecas de ADNc o genómicas, o secciones de gel que contienen un producto digerido con enzimas de restricción de ADN genómico no se debe considerar un polinucleótido aislado. La secuencia de nucleótidos completa para *E. canis* está disponible, p. ej., en GenBank con el número de acceso NCBI: NZ_AAEJ01000001.

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

Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican los polipéptidos de la invención, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90, 96, 98 o 99% idénticas a las secuencias de polinucleótidos y sus complementos también son polinucleótidos contemplados en la presente memoria. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular como se describe en la sección "Polipéptidos". Las secuencias de nucleótidos degeneradas son polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención o fragmentos de los mismos, pero difieren en la secuencia de ácido nucleico 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 se pueden aislar 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, utilizando un sintetizador automático. Se puede utilizar un método de amplificación tal como la PCR para amplificar polinucleótidos de ADN genómico o ADNc que codifican los polipéptidos.

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

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

Los polinucleótidos de la invención 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 de prueba, tal como una muestra biológica. Las sondas son moléculas capaces de interactuar con un ácido nucleico diana, típicamente de una manera específica de la secuencia, por ejemplo, a través de hibridación. Los cebadores son un subconjunto de sondas que pueden soportar una manipulación enzimática y que pueden hibridar con un ácido nucleico diana de manera que se produzca la manipulación enzimática. Se puede elaborar un cebador a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados de nucleótidos o análogos disponibles en la técnica que no interfieran en la manipulación enzimática.

Una sonda o cebador puede tener aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos contiguos que codifican los polipéptidos que se muestran, p. ej., en SEQ ID NO: 22-33.

La hibridación de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica. Típicamente, se puede elaborar una sonda a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados de nucleótidos o análogos disponibles en la técnica. La capacidad de tales sondas y cebadores para hibridar específicamente con las secuencias polinucleotídicas de *E. canis* les permitirá ser útiles para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra de prueba dada. Las sondas y los cebadores polinucleotídicos de la invención pueden hibridar con secuencias complementarias en una muestra de prueba, tal como una muestra biológica, que incluye saliva, esputo, sangre, plasma, suero, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas o tejido. Los polinucleótidos de la muestra se pueden someter, por ejemplo, a electroforesis en gel u otras técnicas de separación por tamaño o se pueden inmovilizar sin separación por tamaño. Las sondas o cebadores polinucleotídicos se pueden marcar. Las marcas adecuadas y los métodos para marcar las sondas y los cebadores son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas incorporadas por traslación de muescas o por quinasa, marcas de biotina, marcas fluorescentes, marcas quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, marcas de quelantes de metales y marcas enzimáticas. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con las sondas o cebadores en condiciones de hibridación de rigurosidades adecuadas.

Dependiendo de la aplicación, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para lograr 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 rigurosas, tales como condiciones de baja concentración de sal y/o alta temperatura, tales como las que proporciona una concentración de sal de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M de sal a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Para aplicaciones que requieren menos selectividad, se pueden utilizar condiciones de hibridación menos rigurosas. Por ejemplo, condiciones de concentración de sal de aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o cebador y un polinucleótido complementario de la muestra de prueba indica la presencia de *E. canis* o un polinucleótido de *E. canis* en la muestra.

Anticuerpos

Se contemplan en la presente memoria moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de *E. canis* de la invención, polipéptidos variantes de la invención, o fragmentos de los mismos. Un anticuerpo puede ser específico para un polipéptido de *Ehrlichia canis*, por ejemplo, un anticuerpo específico para uno o más de SEQ ID NO: 10, 22-33. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos son la porción de unión a antígeno 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 de cadena pesada constante de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y F_v.

Un anticuerpo puede ser cualquier clase de anticuerpo, incluyendo por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo o fragmento del mismo se unen a un epítipo de un polipéptido de la invención. Se puede elaborar un anticuerpo *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. Véase, 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 administrando un polipéptido de la invención a un animal, tal como un ser humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobaya, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro o caballo. El suero del animal inmunizado se recoge y los anticuerpos se purifican del plasma, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, tal como la cromatografía de afinidad. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos policlonales son conocidas en la técnica.

"Se une específicamente" o "específico para" significa que un primer antígeno, p. ej., un polipéptido de *E. canis*, reconoce y se une a un anticuerpo de la invención con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. "Se une específicamente" o "específico para" también significa un primer anticuerpo, p. ej., un anticuerpo generado contra SEQ ID NO: 22-33, reconoce y se une a SEQ ID NO: 22-33, con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. Una molécula no específica es un antígeno que no comparte un epítipo común con el primer antígeno. En una realización

- preferida de la invención, una molécula no específica no deriva de *Ehrlichia sp.* y, en particular, no deriva de *Ehrlichia chaffeensis* o *Ehrlichia canis*. "*Ehrlichia sp.*" se refiere a todas las especies del género *Ehrlichia*. Por ejemplo, un anticuerpo producido contra un primer antígeno (p. ej., un polipéptido) al que se une de manera más eficaz que a un antígeno no específico se puede describir como una unión específica para el primer antígeno. En una realización, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención se une específicamente a un polipéptido de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o fragmentos de los mismos cuando se une con una afinidad de unión K_a de 10^7 l/mol o más. La unión específica se puede someter a prueba utilizando, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de transferencia Western utilizando una metodología bien conocida en la técnica.
- Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que (a) compiten con un anticuerpo de referencia por la unión a SEQ ID NO: 22-33 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; (b) se une al mismo epítipo de SEQ ID NO: 22-33 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que un anticuerpo de referencia; (c) se une a SEQ ID NO: 22-33 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos sustancialmente con la misma K_d que un anticuerpo de referencia; y/o (d) se une a SEQ ID NO: 22-33 o fragmentos de los mismos sustancialmente con la misma velocidad de disociación que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido de SEQ ID NO: 22-33 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con una afinidad de unión K_a de 10^7 l/mol o más.
- Además, también se pueden producir fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos presentes en un polipéptido de la invención. Por ejemplo, las células B normales de un mamífero, tal como un ratón, que se inmunizó con un polipéptido de la invención, se pueden fusionar, por ejemplo, con células de mieloma de ratón sensibles a HAT para producir hibridomas. Los hibridomas productores de anticuerpos específicos de *E. canis* se pueden identificar utilizando RIA o ELISA y aislar mediante clonación en agar semisólido o mediante dilución limitante. Los clones que producen anticuerpos específicos de *E. canis* se aíslan mediante otra ronda de escrutinio. Los anticuerpos monoclonales se pueden escrutar para determinar su especificidad utilizando mecanismos convencionales, por ejemplo, uniendo un polipéptido de la invención a una placa de microtitulación y midiendo la unión del anticuerpo monoclonal mediante un ensayo ELISA. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar directamente, mediante selección a partir de la fusión inicial, o se pueden preparar de manera secundaria, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente utilizando una técnica de selección sib para aislar variantes de cambio de clase. Véase Steplewski et al., *P.N.A.S. EE.UU.* 82:8653 1985; Spria et al., *J. Immunolog. Meth* 74:307, 1984. Los anticuerpos monoclonales de la invención también pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes. Véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.474.893; la Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567. Los anticuerpos de la invención también se pueden construir químicamente. Véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.676.980.
- Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos quiméricos (véase, p. ej., la Patente de 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 producir, por ejemplo, mediante inmortalización directa, presentación en fagos, ratones transgénicos o una metodología Trimera, 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 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33), 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, plasma, fecal, célula, tejido, orina o saliva de un animal infectado por *E. canis* tal como un ser humano o un perro. Un inmunoensayo para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoensayo para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de *E. canis*, una combinación de anticuerpos monoclonales específicos para epítopos de un polipéptido de *E. canis*, anticuerpos monoclonales específicos para epítopos de diferentes polipéptidos de *E. canis*, anticuerpos policlonales específicos para el mismo antígeno de *E. canis*, anticuerpos policlonales específicos para diferentes antígenos de *E. canis*, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos de inmunoensayo se pueden basar, por ejemplo, en ensayos competitivos, de reacción directa o de tipo sándwich utilizando, por ejemplo, anticuerpos marcados. Los anticuerpos de la invención se pueden marcar con cualquier tipo de marca conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, de metales coloidales, radioisótopos y bioluminiscentes.
- Los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno 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 de vacuna de *E. canis*. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magletita.
- Los anticuerpos de la invención 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, por ejemplo, por adsorción o por medio de un enlace covalente, de modo que los anticuerpos conserven su actividad

5 inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos espaciadores para que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados se pueden utilizar a continuación para que se unan a organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* de una muestra, tal como una muestra biológica que incluya saliva, suero, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas o tejido. Los organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* unidos se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, por medio de un cambio en el pH.

10 Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y distribución de un polipéptido de la invención durante diversos eventos celulares o condiciones fisiológicas. Los anticuerpos también se pueden utilizar para identificar moléculas involucradas en la inmunización pasiva e identificar moléculas involucradas en la biosíntesis de antígenos no proteicos. La identificación de tales moléculas puede ser útil en el desarrollo de vacunas. Los anticuerpos de la invención, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena sencilla, se pueden utilizar para controlar el curso de la mejora de una enfermedad causada por *E. canis*. Midiendo el aumento o la disminución de anticuerpos de *E. canis* específicos para antígenos de *E. canis* en una muestra de prueba de un animal, se puede determinar si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar el trastorno es eficaz. Los anticuerpos se pueden detectar y/o cuantificar utilizando, por ejemplo, ensayos de unión directa tales como RIA, ELISA o transferencia Western.

Detección

20 Los métodos de la invención se pueden utilizar para detectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno específicos para antígenos de *Ehrlichia canis* o polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba, tal como una muestra biológica, una muestra ambiental o una muestra de laboratorio. Una muestra de prueba puede comprender potencialmente polinucleótidos de *Ehrlichia sp.*, polinucleótidos de *Ehrlichia canis*, polipéptidos de *Ehrlichia sp.*, polipéptidos de *Ehrlichia canis*, anticuerpos específicos para *Ehrlichia sp.* y/o anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis*, polinucleótidos y polipéptidos no relacionados, combinaciones de los mismos, o ninguno de los anteriores. Una muestra biológica puede incluir, por ejemplo, suero, sangre, células, plasma, saliva, orina, heces o tejido de un mamífero tal como un caballo, gato, perro o ser humano. La muestra de prueba se puede tratar, precipitar, fraccionar, separar, diluir, concentrar o purificar.

30 En una realización, los métodos de la invención comprenden poner en contacto uno o más polipéptidos de la invención con una muestra de prueba en condiciones que permitan la formación de complejos de polipéptido/ anticuerpo, es decir, inmunocomplejos. Es decir, los polipéptidos de la invención se unen específicamente a anticuerpos específicos para antígenos de *Ehrlichia canis* localizados en la muestra. En una realización de la invención, uno o más polipéptidos de la invención se unen específicamente a anticuerpos que son específicos para los antígenos de *Ehrlichia canis* y no se unen específicamente a antígenos de otros patógenos, tales como, por ejemplo, antígenos de *Ehrlichia chaffeensis*. Un experto en la técnica está familiarizado con los ensayos y las condiciones que se utilizan para detectar la unión del complejo de anticuerpo/polipéptido. Se detecta la formación de un complejo entre polipéptidos y anticuerpos de la muestra. La formación de complejos de anticuerpo/polipéptido es una indicación de que los polipéptidos de *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra. La falta de detección de los complejos de polipéptido/anticuerpo es una indicación de que los polipéptidos de *Ehrlichia canis* no están presentes en la muestra.

40 Los anticuerpos pueden ser utilizados en un método de detección de antígenos de *Ehrlichia canis* obteniendo una muestra de prueba, p. ej., de un ser humano o animal sospechosos de tener una infección por *Ehrlichia canis*. La muestra de prueba se pone en contacto con anticuerpos en condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo-antígeno (es decir, inmunocomplejos). Un experto en la técnica es consciente de las condiciones que permiten y son apropiadas para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo. La cantidad de complejos de anticuerpo-antígeno se puede determinar mediante una metodología conocida en la técnica. Un nivel más alto que el formado en una muestra de control negativo indica la presencia de antígenos de *Ehrlichia canis*. Una muestra de control negativo es una muestra que no comprende ningún polipéptido de *Ehrlichia canis*. En una realización de la invención, el control negativo no contiene polipéptidos de *Ehrlichia sp.* En una realización de la invención, un anticuerpo es específico para antígenos de *Ehrlichia canis* y no es específico para antígenos de otros patógenos, tales como por ejemplo, antígenos de *Ehrlichia chaffeensis*. Alternativamente, un polipéptido de la invención se puede poner en contacto con una muestra de prueba. Los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba positiva formarán complejos de antígeno-anticuerpo en condiciones adecuadas. La cantidad de complejos de anticuerpo-antígeno se puede determinar por medio de métodos conocidos en la técnica.

55 En una realización de la invención, se puede detectar en un sujeto una infección por *Ehrlichia canis*. Se obtiene una muestra biológica del sujeto. Uno o más polipéptidos purificados que consisten en SEQ ID NO: 33 u otros polipéptidos descritos en la presente memoria se ponen en contacto con la muestra biológica en condiciones que permiten la formación de complejos de polipéptido/anticuerpo. Se detectan los complejos de polipéptido/anticuerpo. La detección de los complejos de polipéptido/anticuerpo es una indicación de que los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* están presentes. La falta de detección de los complejos de polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero no tiene anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis*.

60 En una realización de la invención, los anticuerpos contra *Ehrlichia canis* detectados mediante un inmunoensayo de la invención son IgG, IgM, IgA, IgD o IgE. En otra realización de la invención, los anticuerpos utilizados para detectar

antígenos de *Ehrlichia canis* son IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

En una realización de la invención, se puede detectar la infección por *Ehrlichia canis* en un sujeto aproximadamente 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días o más después de que el sujeto adquiriera la infección por *Ehrlichia canis*. En una realización de la invención, se puede detectar la infección por *Ehrlichia canis* en un sujeto aproximadamente 21 días, 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días o menos después de que el sujeto adquiriera la infección por *Ehrlichia canis*.

En una realización de la invención, el complejo de polipéptido/anticuerpo se detecta cuando un reactivo indicador, tal como un producto conjugado de enzima, que está unido al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal se puede aplicar al complejo de polipéptido/anticuerpo en condiciones que permiten la formación de un complejo de polipéptido/anticuerpo/indicador. Se detecta el complejo de polipéptido/anticuerpo/indicador. Opcionalmente, el polipéptido o anticuerpo se pueden marcar con un reactivo indicador antes de la formación de un complejo de polipéptido/anticuerpo. El método puede comprender opcionalmente un control positivo o negativo.

En una realización de la invención, uno o más anticuerpos de la invención están anclados a una fase sólida o sustrato. Se añade al sustrato una muestra de prueba que potencialmente comprende una proteína que comprende un polipéptido de la invención. Se añaden uno o más anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. Los anticuerpos pueden ser los mismos anticuerpos utilizados en la fase sólida o pueden ser de una fuente o especie diferente y pueden estar unidos a un reactivo indicador, tal como un producto conjugado con enzima. Las etapas de lavado se pueden realizar antes de cada adición. Se añade un cromóforo o sustrato de enzima y se permite que se desarrolle color. La reacción de coloración se detiene y el color se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, un espectrofotómetro.

En otra realización de la invención, uno o más anticuerpos de la invención están anclados a una fase sólida o sustrato. Se añade al sustrato una muestra de prueba que potencialmente comprende una proteína que comprende un polipéptido de la invención. Se añaden segundos anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. Estos segundos anticuerpos son de una especie diferente que los anticuerpos de la fase sólida. Se añaden terceros anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a los segundos anticuerpos y que no se unen específicamente a los anticuerpos de la fase sólida. Los terceros anticuerpos pueden comprender un reactivo indicador tal como un producto conjugado enzimático. Las etapas de lavado se pueden realizar antes de cada adición. Se añade un cromóforo o sustrato de enzima y se permite que se desarrolle color. La reacción de coloración se detiene y el color se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, un espectrofotómetro.

Los ensayos de la invención incluyen, pero no se limitan a aquellos basados en ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich, que incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), transferencia Western, IFA, radioinmunoensayo (RIA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) y ensayos de placa de microtitulación (cualquier ensayo realizado en uno o más pocillos de una placa de microtitulación). Un ensayo de la invención comprende un ensayo de unión cromatográfica de flujo reversible, por ejemplo, un ensayo SNAP®. Véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.726.010.

Los ensayos pueden utilizar fases sólidas o sustratos o se pueden realizar por medio de inmunoprecipitación o cualquier otro método que no utilice fases sólidas. Cuando se utiliza una fase sólida o un sustrato, uno o más polipéptidos de la invención se anclan directa o indirectamente a un soporte sólido o un sustrato, tal como un pocillo de microtitulación, una esfera magnética, una esfera no magnética, una columna, una matriz, una membrana, una esterilla fibrosa compuesta por fibras sintéticas o naturales (p. ej., materiales con una base de vidrio o celulosa o polímeros termoplásticos, tales como polietileno, polipropileno o poliéster), una estructura sinterizada compuesta por materiales particulados (p. ej., vidrio o varios polímeros termoplásticos), o una película de membrana moldeada compuesta por nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares (generalmente de naturaleza sintética). En una realización de la invención, un sustrato consiste en partículas finas de polietileno sinterizadas, comúnmente conocidas como polietileno poroso, por ejemplo, polietileno poroso de 10-15 micras de Chromex Corporation (Albuquerque, NM). Todos estos materiales sustrato se pueden utilizar en conformaciones adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o se pueden aplicar como recubrimiento, adherir o laminar a portadores inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas plásticas o tejidos. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analitos, p. ej., polipéptidos de *E. canis*, sobre un dispositivo o soporte sólido, se realiza de manera que el reactivo de captura de analito no sea eliminado mediante lavado por la muestra, el diluyente y/o los procedimientos de lavado. Se pueden anclar uno o más reactivos de captura de analitos a una superficie por adsorción física (es decir, sin la utilización de conectores químicos) o por unión química (es decir, con el uso de conectores químicos). La unión química puede generar un anclaje más fuerte de los reactivos de captura sobre una superficie y proporcionar una orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

En un tipo de formato de ensayo, se pueden aplicar como recubrimiento uno o más polipéptidos sobre una fase sólida o sustrato. Una muestra de prueba sospechosa de contener anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se incuban con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal

conjugado con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo específicos para *Ehrlichia canis* durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de antígeno/anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos de la muestra de prueba para los polipéptidos de la fase sólida o el compuesto reactivo indicador conjugado con un anticuerpo específico para los polipéptidos de *Ehrlichia canis* de la fase sólida. La reducción en la unión del reactivo indicador conjugado con anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* a la fase sólida se puede medir cuantitativamente. Una reducción medible en la señal en comparación con la señal generada a partir de, p. ej., una muestra de prueba negativa para *Ehrlichia canis* confirmada indica la presencia de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en la muestra de prueba. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

En otro tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos de la invención se aplican como recubrimiento sobre un soporte o sustrato. Un polipéptido de la invención se conjuga con un reactivo indicador y se añade a una muestra de prueba. Esta mezcla se aplica al soporte o sustrato. Si los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra de prueba, unirán los uno o más polipéptidos conjugados a un reactivo indicador y a los uno o más polipéptidos inmovilizados sobre el soporte. A continuación se puede detectar el complejo de polipéptido/anticuerpo/indicador. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

En otro tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos de la invención se aplican como recubrimiento sobre un soporte o sustrato. La muestra de prueba se aplica al soporte o sustrato y se incuba. Los componentes no unidos de la muestra se eliminan mediante lavado del soporte sólido con una solución de lavado. Si se encuentran presentes anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* en la muestra de prueba, se unirán al polipéptido aplicado como recubrimiento sobre la fase sólida. Este complejo de polipéptido/anticuerpo se puede detectar utilizando un segundo anticuerpo específico de especie que se conjuga con un reactivo indicador. El complejo indicador de polipéptido/anticuerpo/anticuerpo anti-especie se puede detectar a continuación. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

Otra realización de la invención proporciona un dispositivo que es adecuado para un ensayo de flujo lateral. Por ejemplo, se añade una muestra de prueba a una matriz de flujo en una primera región (una zona de aplicación de muestra). La muestra de prueba es transportada en una ruta de flujo de fluido por acción capilar a una segunda región de la matriz de flujo donde una marca capaz de unirse y formar un primer complejo con un analito en la muestra de prueba. El primer complejo se lleva a una tercera región de la matriz de flujo, donde un polipéptido de *E. canis* está inmovilizado 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 contra *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 contra *E. canis*. La marca que forma parte del segundo complejo se puede visualizar directamente.

En otro aspecto, la invención incluye uno o más reactivos de unión específicos marcados que se pueden mezclar con una muestra de prueba antes de la aplicación a un dispositivo de la invención. En este caso, no es necesario tener reactivos de unión específicos marcados depositados y secados sobre un lecho de reactivo de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, ya sea añadido a una muestra de prueba o pre-depositado sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une específicamente a un anticuerpo contra *E. canis*.

Un antígeno DIVA de *E. canis* o un antígeno de vacuna 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, se puede añadir a la muestra antes de añadir la muestra al dispositivo, o se puede incorporar el segundo reactivo de captura de analito al dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de unión específica marcado se puede depositar y secar sobre una trayectoria de flujo de fluido que proporciona comunicación de fluido entre la zona de aplicación de la muestra y la fase sólida. El contacto del reactivo de unión específica marcado con la muestra de fluido 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., 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 solo 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 de analitos. 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 que facilita la detección de la formación del complejo en la zona reactiva al eliminar el reactivo marcado no unido.

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

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 mayor parte o todo el material no unido en exceso se transporta fuera de la segunda región, momento en el cual se produce el producto final detectable.

5 La formación de un complejo de polipéptido/anticuerpo o un complejo de polipéptido/anticuerpo/indicador se puede detectar mediante, por ejemplo, métodos radiométricos, colorimétricos, fluorométricos, de separación por tamaño o de precipitación. Opcionalmente, la detección de un complejo de polipéptido/anticuerpo es mediante la adición de un anticuerpo secundario que se acopla a un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal. Los reactivos indicadores que comprenden compuestos generadores de señal (marcas) asociados con un complejo de polipéptido/anticuerpo se pueden detectar utilizando los métodos descritos anteriormente e incluyen agentes cromogénicos, catalizadores tales como productos conjugados enzimáticos, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcas visuales directas, así como cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Los ejemplos de productos conjugados enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y similares. La selección de una marca en particular no es crítica, pero ésta será capaz de producir una señal por sí misma o junto con una o más sustancias adicionales.

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

20 Los métodos de la invención también pueden indicar la cantidad o cuantía de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba. Con muchos reactivos indicadores, tales como los productos conjugados de enzimas, la cantidad de anticuerpo presente es proporcional a la señal generada. Dependiendo del tipo de muestra de prueba, ésta se puede diluir con un reactivo de tampón adecuado, concentrar o poner en contacto con una fase sólida sin ninguna manipulación. Por ejemplo, generalmente se prefiere someter a prueba muestras de suero o plasma que previamente se hayan diluido, o especímenes concentrados tales como orina, para determinar la presencia y/o cantidad de anticuerpo presente.

La invención se puede utilizar adicionalmente en relación con kits de ensayo (p. ej., artículos de fabricación) para detectar anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, o polipéptidos de *Ehrlichia canis* en una muestra. Un kit comprende uno o más polipéptidos de la invención y medios para determinar la unión del polipéptido a anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o fragmentos de anticuerpos de la muestra. Un kit o artículo de fabricación también puede comprender uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y medios para determinar la unión de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a polipéptidos de *Ehrlichia canis* en la muestra. Un kit puede comprender un dispositivo que contiene uno o más polipéptidos o anticuerpos e instrucciones para el uso de los uno o más polipéptidos o anticuerpos, p. ej., para la identificación de una infección por *Ehrlichia canis* en un mamífero. El kit también puede comprender material de envasado que comprende una marca que indica que uno o más polipéptidos o anticuerpos del kit se pueden utilizar para la identificación de una infección por *Ehrlichia canis*. Otros componentes tales como tampones, estabilizadores, controles positivos, controles negativos, reactivos detectores y similares, conocidos por los expertos en la técnica, se pueden incluir en tales kits de prueba. Los polipéptidos, anticuerpos, ensayos y kits son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de casos individuales de infección por *Ehrlichia canis* en un paciente, así como en estudios epidemiológicos de brotes de *Ehrlichia canis*. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar, para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, generalmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para combinar con una muestra.

45 Los polipéptidos y los ensayos de la invención se pueden combinar con otros polipéptidos o ensayos para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* junto con otros organismos. Por ejemplo, los polipéptidos y los ensayos de la invención se pueden combinar con reactivos que detectan dirofilaria y/o *Borrelia burgdorferi* y/o *Ehrlichia chaffeensis* y/o *Anaplasma Platys* y/o *Anaplasma phagocytophilum*.

Se pueden utilizar polinucleótidos para detectar la presencia de polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra. Los polinucleótidos se pueden utilizar para detectar polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra por una simple reacción de hibridación y también se pueden utilizar, p. ej., en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) tales como una reacción de PCR en tiempo real. Los métodos y composiciones de la invención también se pueden utilizar para detectar diferencialmente la presencia *Ehrlichia canis* de otra *Ehrlichia sp.*, tal como *Ehrlichia chaffeensis*.

Los ensayos de PCR están bien descritos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.683.195; la Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.202; la Patente de Estados Unidos Núm. 4.965.188. En general, los cebadores polinucleotídicos se reasocian a hebras desnaturalizadas de un ácido nucleico diana. Los productos de extensión de cebadores se forman por polimerización de desoxinucleósidos trifosfato por medio de una polimerasa. La PCR implica a continuación ciclos repetitivos de desnaturalización del ácido nucleico molde, reasociación del cebador y extensión de los cebadores reasociados por la acción de una polimerasa termoestable. El procedimiento da como resultado una amplificación exponencial de los ácidos nucleicos diana de *Ehrlichia canis* en la muestra de prueba, lo que permite la detección de polinucleótidos diana existentes en concentraciones muy bajas en

una muestra.

Los ensayos de PCR en tiempo real se basan en la detección de una señal, p. ej., una señal indicadora fluorescente. Esta señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en una reacción. La PCR en tiempo real es cualquier técnica de amplificación que permita controlar la evolución de una reacción de amplificación en curso.

5 Véanse, *Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Detection*, Perkin Elmer Applied Biosystems (1999); *PCR Protocols* (Academic Press Nueva York, 1989). Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible controlar la reacción de PCR durante la fase exponencial, donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial del molde diana. Cuanto mayor sea el número de copias de partida de la diana del ácido nucleico, más pronto se observará un aumento significativo en la fluorescencia.

10 En la presente memoria se contempla un método para detectar y/o cuantificar polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba. Los cebadores efectores y los cebadores antisentido se pueden añadir a una muestra de prueba en condiciones adecuadas para una reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores hibridan con polinucleótidos de *Ehrlichia canis* de manera que se forma un producto de amplificación si los polinucleótidos de *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra de prueba. Se detectan productos de amplificación y se determina la presencia y/o cantidad de polinucleótidos de *Ehrlichia canis*. Los productos de amplificación se pueden detectar con una sonda polinucleotídica que hibrida, en condiciones adecuadas para una reacción en cadena de la polimerasa, con una secuencia de polinucleótidos de *Ehrlichia canis*. El producto de amplificación se puede cuantificar midiendo una señal de detección de la sonda y comparando dicha señal de detección con una segunda señal de detección de una sonda a partir de un patrón de cuantificación. El patrón de cuantificación se puede extraer en paralelo con la muestra de prueba.

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

Se podría utilizar un polipéptido DIVA de la invención o un polinucleótido o anticuerpo para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Sin embargo, si se utiliza un polipéptido DIVA para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*, posteriormente éste no podría utilizarse como un polipéptido DIVA para la detección y diferenciación de animales infectados, no vacunados y vacunados, ya que el sistema inmunitario de un animal vacunado podría reconocer el antígeno DIVA utilizado para la vacunación. Sin embargo, todavía se puede utilizar como antígeno DIVA de *E. canis* un polipéptido DIVA que no presente reacción cruzada con anticuerpos contra el polipéptido DIVA utilizado para el tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad causada por *E. canis*.

30 Por ejemplo, si se utiliza SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo como una vacuna, en ese caso se pueden utilizar SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o combinaciones de los mismos como un polipéptido DIVA, si no presentan reacción cruzada con anticuerpos específicos para SEQ ID NO: 2. Actualmente, ninguno de SEQ ID NO: 10, 22-33 se utiliza en una vacuna comercial de subunidades contra *E. canis* comercial y SEQ ID NO: 10, 22-33 no detectan anticuerpos específicos de *E. canis* en animales vacunados con células de *E. canis* completas inactivadas. Por lo tanto, la selección del polipéptido DIVA no es actualmente un problema. Sin embargo, los expertos en la técnica son conscientes de la composición de las vacunas contra *E. canis*. Si una vacuna de subunidades contra *E. canis* comercial comprendiera SEQ ID NO: 10,22-33, un experto en la técnica evitaría el uso de SEQ ID NO: 10, 22-33 (si fuera necesario debido a la generación de anticuerpos contra *E. canis* específicos para SEQ ID NO: 10, 22-33) para diferenciar el estado de vacunación y en su lugar utilizarían otros antígenos DIVA de *E. canis*.

40 Por lo tanto, se podrían utilizar polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos DIVA de dos maneras diferentes: (1) como composiciones para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad o infección causada por *E. canis*; y (2) como antígeno DIVA de *E. canis* para la detección y diferenciación de animales que están vacunados; no vacunados; infectados o no infectados por *E. canis*.

45 Los polipéptidos de la invención o polinucleótidos y anticuerpos se pueden utilizar para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo, se puede administrar a un animal, tal como un ser humano. En una realización de la invención, un anticuerpo o fragmento del mismo se administra 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 para aliviar los síntomas de infección por *E. canis* o para reducir la cantidad de organismos de *E. canis* en un sujeto.

55 Los polipéptidos de la invención o polinucleótidos pueden estar presentes en una composición inmunogénica y se pueden utilizar para provocar una respuesta inmunitaria en un anfitrión. Una composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. Un polipéptido inmunogénico de la invención o composición polinucleotídica es particularmente útil para sensibilizar un sistema inmunitario de un animal de tal manera que, como resultado, se produzca una respuesta inmunitaria que mejore o evite el efecto de la infección por *E. canis*. La provocación de una respuesta inmunitaria en un modelo animal puede ser útil para determinar, por ejemplo, las dosis o las vías de administración óptimas. La provocación de una respuesta inmunitaria también se puede utilizar para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o infección causada por *E. canis*. Una respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias humorales o respuestas inmunitarias mediadas por células, o una combinación de las mismas.

Una respuesta inmunitaria también puede comprender la promoción de una respuesta generalizada del anfitrión, p. ej., promoviendo la producción de defensas.

La generación de un título de anticuerpos por un animal contra *E. canis* puede ser importante en la protección contra la infección y el aclaramiento de la infección. Se pueden utilizar la detección y/o cuantificación de títulos de anticuerpos después del suministro de un polipéptido o polinucleótido para identificar epítomos que son particularmente eficaces en la obtención de títulos de anticuerpos. Los epítomos responsables de una fuerte respuesta de anticuerpos a *E. canis* se pueden identificar provocando anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de *E. canis* de diferentes longitudes. Los anticuerpos provocados por un epítopo polipeptídico particular se pueden someter a prueba utilizando, por ejemplo, un ensayo ELISA para determinar qué polipéptidos contienen epítomos que son más eficaces para generar una respuesta fuerte. Los polipéptidos o proteínas de fusión que contienen estos epítomos o polinucleótidos que codifican los epítomos se pueden construir a continuación y se pueden utilizar para provocar una fuerte respuesta de anticuerpos.

Se puede administrar un polipéptido de la invención, polinucleótido o anticuerpo 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 obtener anticuerpos *in vivo*. La inyección de un polinucleótido tiene las ventajas prácticas de la simplicidad de construcción y modificación.

Adicionalmente, 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 modificaciones postraduccionales, estructura y conformación nativas. Un polinucleótido se puede suministrar a un sujeto en forma de "ADN desnudo".

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

Los portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico 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 no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el anfitrión. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandes, de metabolismo lento, tales como proteínas, polisacáridos tales como SEPHAROSE® funcionalizado con látex, agarosa, celulosa, esferas 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 virales o células bacterianas inactivas y avirulentas. Los liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y bioadhesivos también se pueden utilizar como un portador para una composición de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden utilizar en composiciones de la invención, por ejemplo, sales minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Los sustratos de proteínas 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 de la invención 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, malodextrina, etanol o similares, solos o combinados, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de ajuste de tonicidad, detergentes o agentes de tamponamiento del pH. También se pueden utilizar agentes activos adicionales, tales como agentes bactericidas.

Si se desea, se pueden incluir en la composición de la invención moléculas coestimuladoras que mejoren 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. Opcionalmente, también se pueden incluir en la composición coadyuvantes. Los coadyuvantes son sustancias que se pueden utilizar para aumentar de manera no específica una respuesta inmunitaria específica. En general, se mezclan un coadyuvante y un polipéptido de la invención 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 completos e incompletos de Freund), sales minerales (p. ej., Alk(SO₄)₂; AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄), sílice, alumbre, Al(OH)₃ y Ca₃(PO₄)₂), polinucleótidos (es decir ácidos poli-IC y poli-AU) y ciertas sustancias naturales (p. ej., cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como las 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-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637), conocida como nor-MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno/TWEEN® 80 al 2%.

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

- 5 La administración de polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos puede provocar una respuesta inmunitaria en el animal que dura por lo menos 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año o más. Opcionalmente, se puede mantener una respuesta inmunitaria en un animal al administrar una o más inyecciones de refuerzo del polipéptido, polinucleótido o anticuerpos 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año o más después de la inyección principal. Si se desea, también se pueden proporcionar moléculas coestimuladoras o coadyuvantes antes, después o junto con las composiciones.
- 10 Una composición de la invención 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 detectada, por ejemplo, por un ELISA. Un polinucleótido se puede inyectar por vía intramuscular a un mamífero, tal como un babuino, un chimpancé, un perro o un 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. El polipéptido o anticuerpo se puede inyectar por vía intramuscular a un mamífero en una dosis de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 o 10 mg/kg.

Los polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos, o una combinación de los mismos, se pueden administrar a un animal que no esté infectado con *E. canis* o se pueden administrar a un animal infectado con *E. canis*. Las dosis particulares de polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos en una composición dependerán de muchos factores que incluyen, pero no se limitan 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. La cantidad eficaz de la composición de la invención se puede determinar fácilmente utilizando solo experimentación de rutina.

También se proporciona un método de control de una infección por *E. canis* en un paciente. El método incluye determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una muestra de un fluido biológico de un paciente que sufre o que corre riesgo de infección por *E. canis* en un primer momento utilizando polipéptidos de la invención. El nivel de anticuerpos anti-*E. canis* se determina en una o más muestras del fluido biológico del paciente en uno o más puntos temporales diferentes. Los niveles de anticuerpos anti-*E. canis* se determinan en diferentes puntos de tiempo de manera que se controla la infección por *E. canis*. El nivel o cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* proporcionan una indicación del éxito del tratamiento o la terapia, o de la progresión de la infección.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y otros escritos científicos o técnicos mencionados en cualquier parte de la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. La invención descrita ilustrativamente en la presente memoria de manera adecuada se puede poner en práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en la presente memoria. Por lo tanto, por ejemplo, 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, a la vez que mantienen sus significados ordinarios. 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, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que, aunque la presente invención ha sido específicamente descrita por medio de realizaciones, los expertos en la técnica pueden recurrir a las características opcionales, la modificación y la variación de los conceptos descritos en la presente memoria, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención tal como se define en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas.

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 del grupo de Markush u otro grupo.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de *E. canis* inactivada con formalina para la inmunización en perros

Se hizo crecer *E. canis* en cultivo de células caninas utilizando los métodos descritos en la bibliografía. Véase, p. ej., Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol. 42:362-368. Utilizando microscopía óptica, se estimó que las células 030 resultaban 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 conservó proporcionando 7,31 g de material (peso húmedo). Se presume que el agua representa 80% del peso del material, lo que proporciona un peso seco estimado de 1,462 gramos (20% del peso del material). El sedimento celular se resuspendió a 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 HT50-1-2 Solución de Formalina al 10%, tamponada neutra) para una concentración final de formaldehído de 0,04%. La solución se agitó durante la noche a 4°C. La mezcla inactivada se centrifugó y se conservó el sedimento celular. 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 en 73 viales con tapón de rosca y se congeló a -80°C. Cada vial contiene 20 mg (peso seco) de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina, adecuada para combinar con el coadyuvante apropiado para la inmunización en animales.

Ejemplo 2

5 Preparación de *E. canis* inactivada con formalina con dos coadyuvantes diferentes, protocolo para la inmunización de perros beagle con antígeno de *E. canis*, y prueba 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.

10 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 anteriormente y se prepararon dos conjuntos de dosis con coadyuvante Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina (peso seco).

15 Se seleccionaron perros beagle de laboratorio mantenidos en perreras para la inmunización con el antígeno de *E. canis* inactivado con formalina. A dos grupos de dos perros cada uno; utilizando en cada grupo un coadyuvante diferente, se les administró preparación de *E. canis* inactivada con formalina (óxido de aluminio o Ribí). El día 0, se encontró que los 4 perros eran seronegativos utilizando tanto el diagnóstico SNAP® 3Dx® como el análisis de transferencia Western utilizando el organismo *E. canis*.

20 El comité IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de los perros beagle de laboratorio. Los perros fueron vacunados los días 0, 28 y 56, y se tomaron muestras de 1 ml semanales que se controlaron utilizando SNAP® 3Dx®. A todos los perros se les administraron dosis del artículo de prueba apropiado por vía subcutánea en el área dorsoescapular. Los cuatro animales experimentaron seroconversión a una prueba positiva en *E. canis* SNAP® 3Dx® sobre el día 42. Las extracciones de sangre de producción se tomaron los días 42 y 70 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjo aproximadamente 25 ml de suero).

25 La Figura 1 muestra la evaluación del Ensayo SNAP® 3Dx® de los 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. La mancha positiva para *E. canis* se vuelve positiva en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

30 Los experimentos con una tercera vacuna que comprende un tercer 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 que: 1) la inactivación con formalina fue de 24 horas a 4 C, y 2) se añadió 1 mg de BCG. El calendario de vacunación fue el día 0, el día 14, con tomas de muestras de sangre semanales analizadas para determinar la reactividad con proteínas de *E. canis*.

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

Para el aislamiento del ADN y el análisis de transferencia Western, *E. canis* se enriqueció a partir de cultivo celular utilizando gradientes de densidad PERCOLL®. El proceso de aislamiento de patógenos intracelulares del cultivo celular, tal 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.

40 Un enriquecimiento de *E. canis* típico comenzó con 1,5 litros de cultivo de células infectadas (véase más arriba). Las células se centrifugaron a 6.000 x g, el sedimento celular se conservó y el sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió en 20 ml de PBS, seguido de una segunda centrifugación. El sobrenadante se descartó y el sobrenadante se conservó. El sedimento se resuspendió a continuación en 20 ml de PBS, se trató con ultrasonidos durante 5 segundos a 20 kHz, con un ajuste de potencia a 1,5 utilizando un sonicador Branson. La muestra se centrifugó después a 500 x g durante 5 minutos para sedimentar los desechos grandes.

45 Se añadió PERCOLL® al sobrenadante a una concentración final de 32% (4,5 ml de PERCOLL® con 10 ml de muestra). La muestra se cargó en tubos Oak Ridge compatibles con un rotor de ultracentrífuga de 70,1 Ti y se centrifugó durante 30 minutos a 63.000 x g. La banda opaca se recogió utilizando una pipeta Pasteur. La banda opaca está altamente enriquecida en *Ehrlichia* (confirmado utilizando 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 sedimento de *Ehrlichia* se almacenó -80°C.

50 Ejemplo 4 Ensayo de sueros o plasma de perros vacunados e infectados por transferencia Western

El uso del análisis en gel SDS-PAGE unidimensional y el análisis en gel bidimensional (isoelectroenfoco de 1ª

dimensión, SDS-PAGE de 2ª dimensión) 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 proteínas separadas utilizando estos métodos 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 10.8.1-10.8.116.

El trabajo inicial se llevó a cabo utilizando el análisis Western de proteínas separadas con geles 1D (datos no mostrados), seguido del análisis Western de proteínas separadas utilizando geles 2D. Las proteínas de *E. canis* completa recogidas de cultivos celulares se analizaron utilizando electroforesis en gel 2D (materiales y reactivos utilizados según lo descrito por el fabricante; Bio-Rad Life Sciences Research, Hercules, CA 94547). La cantidad de muestra a cargar por gel se determinó empíricamente (véase la Figura 2). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con sueros caninos de perros beagle de laboratorio el día 0, perros vacunados con antígeno de *E. canis* inactivado con formalina (véase más arriba), o sueros de animales infectados por *E. canis* (véanse las Figuras 3, 4 y 5).

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

Para el análisis de transferencia Western, las proteínas se separaron utilizando geles SDS-PAGE 1D o isoelectroenfoque 2D/SDS-PAGE seguido de electrotransferencia de las proteínas desde los geles a nitrocelulosa. Las manchas de la nitrocelulosa se incubaron en una solución de bloqueo de leche desnatada seca al 2,5% disuelta en solución salina tamponada con Tris (pH 7,5), TWEEN® 20 al 0,05%. Se diluyeron el suero o el plasma caninos hasta el título que se describe en el tampón que contiene producto lisado de *E. coli* para bloquear la unión no específica con sueros de ternera normal 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 sueros de ternera fetal al 50%, TBS-TWEEN®-Kathon al 50% (0,05% y 0,5% respectivamente) para prevenir la unión no específica de un 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 Reactivos de Detección de Transferencia Western ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855-1327) utilizado como describe el fabricante. Las imágenes digitales de la película de rayos X expuesta se capturaron utilizando un GelDoc 2000 (Bio-Rad Inc.).

Ejemplo 5 Aislamiento de ADN de *E. canis* y construcción de una biblioteca de expresión lambda y escrutinio de la biblioteca de expresión lambda de *E. canis* para determinar clones que tienen actividad DIVA

La preparación y el escrutinio de bibliotecas de expresión lambda son 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 de *E. canis* aislado del cultivo celular mediante centrifugación en gradiente 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 de Vectores EcoRI/CIAP previamente digeridos con Lambda ZAP® II (Stratagene Corp., La Jolla, CA 92037) según lo especificado por el fabricante para la construcción de la biblioteca. El ADN genómico de *E. canis* se digirió parcialmente con TSP509 y se aislaron fragmentos que oscilaban entre 2 y 6 kb utilizando electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en el vector lambda. Los fagos fueron empaquetados y cultivados según lo especificado por el fabricante.

Se seleccionaron aproximadamente 120.000 placas de lambda individuales para escrutar su unión a sueros aislados de perros identificados como positivos para la infección por *E. canis*, pero negativos para la reactividad con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina (véase más arriba). Desde el escrutinio inicial se identificaron 84 placas individuales que tenían esta actividad.

Las placas de lambda se sometieron a dos rondas de purificación en placa y se volvieron a someter a prueba para verificar la reactividad positiva con sueros de animales infectados por *E. canis*, reactividad negativa cuando se escrutaron con sueros de animales vacunados.

Las placas de lambda aisladas se escrutaron 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 dirofilariosis canina).

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

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

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

La información de secuencia de las reacciones T7 y T3 para los 43 clones se envió para su análisis BLAST al sitio de la red del NCBI. Los resultados fueron tabulados en un formato de 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 segmentos de ADN genómico para cada clon. Los clones individuales que compartían genes comunes se agruparon para un análisis adicional mediante transferencia Western utilizando grupos de sueros de perros infectados y vacunados. Basándose en los patrones de bandas similares, se eliminaron los clones duplicados. Se eliminaron todos los clones que mostraban reactividad con ambos conjuntos de sueros. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 23 clones para una evaluación adicional. La agrupación de los clones y el antígeno común por grupo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Antígeno común	Números 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

15 Ejemplo 6 Análisis de transferencia Western utilizando muestras individuales de suero canino positivas para *E. canis*

Los 23 clones se analizaron en geles de SDS-PAGE individuales. Cada gel se transfirió a nitrocelulosa y se sometió a transferencia Western utilizando muestras individuales de sueros caninos de perros que solo fueron positivos para infecciones por *E. canis* mediante la prueba 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 la reactividad se detectó mediante técnicas colorimétricas de peroxidasa de rábano picante (Opti-4CN, Bio-Rad). Se evaluaron un total de trece muestras individuales de suero canino. Las transferencias se compararon entre 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 3 y la Figura 6 (los clones enumerados en negrita se muestran en la figura).

Tabla 3

Antígeno común	Números 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

25 Los 23 clones también se analizaron mediante transferencia Western utilizando sueros caninos combinados que

habían dado positivo para otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. Se evaluaron las muestras que dieron positivo por ELISA o SNAP® para las siguientes infecciones individuales: Dirofilariosis, Lyme, *Anaplasma phagocytophilum*, o *E. ewingii*. Ninguno de los clones identificados en la tabla anterior mostró reactividad cruzada con sueros caninos positivos para estas otras infecciones transmitidas por vectores.

5 Ejemplo 7 Identificación de segmentos de genes relevantes que codifican antígenos DIVA de *E. canis*

a. Antígeno de 120 kDa

Este antígeno fue descrito previamente por Yu et al. (J Clin Microbiol. Enero 2000; 38(1):369-74; véase también, McBride et al., 2000 Infec. Immun. 68:13) y se ha demostrado que es útil en el diagnóstico de la infección por *E. canis* en perros. Este antígeno se ha descrito como antígeno "p120" y "p140" de *E. canis*. Véase, id. Yu et al. explican que una proteína recombinante expresada por el gen p120 tiene un tamaño molecular de 140 kDa en un gel de dodecil sulfato de sodio, que es más grande que la masa molecular pronosticada de la proteína. Véase, Yu et al. página 373. El grupo Walker (Yu et al. y McBride et al.) se refieren a la proteína como p120 y como p140 de *E. canis*. Por lo tanto, esta descripción utiliza p120 y p140 de manera indistinta para describir esta proteína. El número de acceso para el gen p120/140 de *E. canis* es AF112369 y la proteína asociada es AAD34330. Véase también, número de acceso YP302666. Los clones 2, 10, 17 y 33 contienen segmentos de longitud completa del gen del antígeno de 120 kDa. El clon 35 puede contener un truncamiento de este gen. (Véanse, SEQ ID NO: 1 y 2).

Este gen fue amplificado a partir de ADN genómico de *E. canis* y subclonado en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia del gen que codificaba la proteína mostrada en SEQ ID NO: 2, desde los aminoácidos 58 a 589. Los productos lisados de proteínas de la bacteria BL21 inducida para expresar esta proteína se analizaron mediante transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con las transferencias Western sondeadas con sueros de animales vacunados con células de *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con los hallazgos anteriores, solo 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, SEQ ID NO: 15. La porción repetida (región subrayada en SEQ ID NO: 15 es un péptido de 60 kD). SEQ ID NO: 16 muestra las 14 repeticiones alineadas. SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia consenso de las 14 repeticiones.

Una realización de la invención proporciona un polipéptido que comprende:

KEEX₁TPEVX₂AEDLQPAVDX₃SX₄EHSSEVVGX₅KVXS₆TS (SEQ ID NO: 17).

30 Donde X₁ = S o N

X₂ = K o R

X₃ = G, D o S

X₄ = V o I

X₅ = E o K

35 X₆ = E o K

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

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

40 b. Antígeno de 200 kDa

Este antígeno fue descrito previamente por McBride et al. (J Clin Microbiol. Enero 2001; 39(1):315-22) y se ha demostrado que es útil en el diagnóstico de la erliquiosis. El número de acceso para este gen es AF252298 y la proteína asociada AAK01145. Una parte de esta secuencia de proteínas está asociada con una patente publicada (SEQ ID NO: 2 de la Patente de 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 erliquiosis y un reactivo DIVA. La porción del gen se extiende desde el nucleótido 1081 de AF252298 hasta el extremo, el nucleótido 4266 (véanse SEQ ID NO: 3 y 4).

Este gen fue amplificado a partir de ADN genómico de *E. canis* y subclonado en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia del gen que codificaba la proteína mostrada en SEQ ID NO: 4, de los aminoácidos 1 a 1061. Se analizaron los productos lisados de proteínas de la bacteria BL21 inducida para

expresar esta proteína mediante transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con las transferencias Western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con los hallazgos anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína de peso molecular esperado (datos no mostrados).

5 c. ATPasa

Este gen (etiqueta de locus "Ecan02000699") ha sido pronosticado por el análisis computacional automatizado de la secuencia del genoma de la pistola génica de *E. canis*. Este codifica una proteína de más de 4.000 aminoácidos (ZP_00210575). El escrutinio de *E. canis* DIVA identificó dos regiones separadas de este gen y su proteína asociada como posibles antígenos DIVA inmunodominantes y reactivos. Los segmentos de la proteína identificados en los clones 84 y 7 son los aminoácidos 1984-2774 y 2980-3740, respectivamente, del número de acceso 46308382. (Véanse SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8).

Ambos fragmentos de este gen fueron amplificados a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonaron por separado en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con las secuencias de genes asociadas con las proteínas mostradas en SEQ ID NO: 6 y 8, desde los aminoácidos 1 a 782 y 1 a 746 respectivamente. Los productos lisados de proteínas de la bacteria BL21 inducida para expresar estas proteínas se analizaron mediante transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con los hallazgos anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron estas proteínas de peso molecular esperado (datos no mostrados).

15 d. Proteínas de choque térmico

Aunque este clon contenía un gen para la proteína de choque térmico, GrpE, la secuencia del gen que codificaba 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 se pronostica a partir de la anotación informática del genoma y que no se ha identificado 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 SEQ ID NO: 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 de 6-His según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia de genes asociada con el número de locus "Ecan02000495". Los productos lisados de proteínas de la bacteria BL21 inducida para expresar esta proteína se analizaron mediante transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con las transferencias Western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con los hallazgos anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína de peso molecular esperado (véase la Figura 7).

30 e. Proteína Ribosomal L1

Este gen se identifica con la etiqueta del locus "Ecan02000476" del genoma de *E. canis*. La proteína asociada tiene el número de acceso ZP_00211130 (véanse 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 aproximadamente 70% idéntica a una proteína de superficie de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576). La inmunoreactividad frente a la proteína de *E. chaffeensis* ha sido referida previamente por Yu et al., (J Clin Microbiol. Agosto 1999; 37(8):2568-75). La proteína de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576) se conoce como el precursor de la proteína de 106 kDa.

35 F. Posibles antígenos que no son 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 inmunodominantes y reactivos DIVA. Por ejemplo, el clon 10 produce un patrón de bandas diferente en las transferencias Western sondeadas con sueros infectados, en comparación con los clones que contienen el antígeno de 120 kDa solamente. El clon 10 contiene información genética para los componentes VirD4 de una vía secretora de Tipo IV y esta secuencia de genes se identifica mediante la etiqueta de locus "Ecan02000624". Este gen codifica una proteína de 723 aminoácidos (ZP_00211244), pero solamente una parte de esta proteína parece ser expresada por el clon 10, según lo determinado por el peso molecular de la proteína identificada en el gel (véanse SEQ ID NO: 13 y 14).

55

Ejemplo 8**Evaluación de Péptidos P140 de *E. canis***

Se sometieron a prueba sueros de perros beagle inmunizados con *E. canis* inactivada con formalina (muestras de vacunas) utilizando un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado utilizando péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis* (también conocida como p120, véase el Ejemplo 7).

La preparación de *E. canis* inactivada con formalina y la inmunización de perros beagle se describieron en los Ejemplos 1 y 2. Las muestras de perros beagle inmunizados se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparados utilizando péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) en formatos de ensayo indirectos y directos.

Formato de ensayo indirecto

Las muestras se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20). Los péptidos individuales se inmovilizaron sobre pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un producto conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) anti-especie, en este caso canina (dilución 1:2.000), lavado y adición de un sustrato de HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación.

Formato de ensayo directo

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

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4. El control positivo (PC, ID 1049: 16E) y el control negativo (NC, 3818: 57B) eran muestras de suero positivas y negativas para *E. canis* conocidas, respectivamente. Todas las muestras se sometieron a prueba utilizando la prueba SNAP® 4Dx® disponible en el mercado para anticuerpos de *E. canis*. Los resultados para muestras temporales secuenciales de 6 perros (CVYDEH, CWMBDC, CVXCMS, CWMAXK, CVSCVA y CVXCAP) que recibieron el antígeno de *E. canis* inactivado con formalina formulado utilizando diferentes coadyuvantes se muestra desde el día 0 hasta el día 42 después de la inmunización. Los resultados de la prueba SNAP® 4Dx® demuestran que se indujo una respuesta de anticuerpos en los animales vacunados. Ninguna de las muestras de suero de animales vacunados fue reactiva en el formato de ensayo directo. Varias muestras (por ejemplo del perro CWMAXK) tuvieron reacciones de fondo elevadas en el formato de ensayo indirecto.

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de la inmunización utilizando la vacuna inactivada con formalina fue significativamente no reactivo a los péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis* (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Tabla 4 Reacción de sueros de perros inmunizados con antígeno de *E. canis* inactivado con formalina medida utilizando ensayos de microtitulación preparados utilizando péptidos derivados de la proteína p140 de *E. canis* (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Muestra	<i>E. canis</i> 4Dx® Resultado	Resultados en placa indirectos (A650)			Resultados en placa directos (A650)		
		SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
1049:16E (PC)	0,72	2,071	2,075	1,867	2,049	1,821	1,495
3818:57B (NC)	N	0,051	0,058	0,050	0,034	0,033	0,035
CVYDEH día 0	N	0,050	0,062	0,045	0,034	0,034	0,035
día 7	N	0,048	0,052	0,042	0,033	0,032	0,036
día 14	N	0,051	0,055	0,048	0,036	0,034	0,038

ES 2 720 363 T3

Muestra	<i>E. canis</i> 4Dx®	Resultados en placa indirectos (A650)			Resultados en placa directos (A650)		
	Resultado	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
día 21	N	0,044	0,062	0,051	0,035	0,034	0,040
día 28	0,04 (vw+)	0,054	0,073	0,055	0,036	0,033	0,034
día 35	0,07 (vw+)	0,049	0,058	0,047	0,033	0,035	0,039
día 42	N	0,051	0,059	0,053	0,034	0,035	0,040
CWMBDC día 0	0,08	0,054	0,085	0,082	0,035	0,033	0,038
día 7	0,20	0,064	0,078	0,072	0,038	0,035	0,035
día 14	0,30	0,058	0,081	0,085	0,038	0,033	0,040
día 21	0,24	0,051	0,101	0,078	0,037	0,040	0,039
día 28	0,22	0,049	0,082	0,073	0,034	0,036	0,033
día 35	0,17	0,043	0,068	0,081	0,033	0,040	0,035
día 42	0,11	0,044	0,071	0,074	0,031	0,034	0,031
CVXCSCM día 0	N	0,049	0,082	0,051	0,033	0,035	0,034
día 7	N	0,038	0,076	0,052	0,034	0,033	0,037
día 14	N	0,044	0,069	0,049	0,033	0,032	0,038
día 21	0,10 (w+)	0,038	0,054	0,045	0,035	0,035	0,036
día 28	0,10 (w+)	0,044	0,060	0,049	0,036	0,033	0,035
día 35	0,08 (vw+)	0,040	0,062	0,053	0,034	0,035	0,041
día 42	0,05 (vw+)	0,041	0,057	0,049	0,033	0,035	0,036
CWMAXK día 0	0,07 (vw+)	0,043	0,078	0,054	0,034	0,039	0,037
día 7	0,41	0,082	0,475	0,413	0,034	0,034	0,045
día 14	0,44	0,049	0,782	0,607	0,034	0,035	0,044
día 21	0,36	0,092	0,587	0,440	0,033	0,037	0,038
día 28	0,39	0,063	0,407	0,258	0,037	0,034	0,038
día 35	0,41	0,056	0,286	0,212	0,036	0,034	0,037
día 42	0,35	0,048	0,196	0,155	0,034	0,034	0,041
CVSCVA día 0	0,10 (w+)	0,039	0,084	0,084	0,033	0,033	0,038
día 7	0,37	0,040	0,107	0,066	0,032	0,032	0,036
día 14	0,14	0,053	0,151	0,062	0,035	0,033	0,039
día 21	0,33	0,057	0,131	0,072	0,035	0,033	0,034
día 28	0,29	0,049	0,104	0,058	0,035	0,034	0,036
día 35	0,36	0,043	0,108	0,079	0,034	0,039	0,040
día 42	0,32	0,047	0,117	0,044	0,033	0,036	0,037
CVXCAP día 0	N	0,041	0,065	0,040	0,032	0,035	0,032
día 7	0,34	0,058	0,106	0,068	0,036	0,033	0,033
día 14	0,30	0,087	0,150	0,112	0,034	0,035	0,039

Muestra	<i>E. canis</i> 4Dx®	Resultados en placa indirectos (A650)			Resultados en placa directos (A650)		
	Resultado	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
día 21	0,35	0,065	0,120	0,086	0,039	0,036	0,041
día 28	0,19	0,054	0,103	0,059	0,035	0,036	0,032
día 35	0,18	0,046	0,092	0,047	0,033	0,033	0,039
día 42	0,19	0,051	0,067	0,047	0,035	0,035	0,038

Ejemplo 9

Se sometieron a prueba sueros de perros positivos y negativos para *E. canis* conocidos utilizando un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado utilizando los péptidos sintéticos obtenidos de la proteína p140 de *E. canis* (también conocida como p120, véase el Ejemplo 7).

Se obtuvieron muestras de campo positivas y negativas para *E. canis* y se sometieron a prueba utilizando la prueba SNAP® 4Dx® para detectar anticuerpos contra *E. canis*. A continuación, las muestras se sometieron a prueba utilizando ensayos directos e indirectos en formato de placa de microtitulación producidos utilizando péptidos sintéticos derivados de la proteína P140 de *E. canis* (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Formato de ensayo indirecto

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

Formato de ensayo directo

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

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

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

Tabla 5 Muestras de campo positivas y negativas para *E. canis* sometidas a prueba utilizando el ensayo indirecto de formato de placa de microtitulación construido utilizando péptidos P140 (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Muestra	4Dx®	Absorbancia a 650 nM		
	Resultado	SEQ ID NO: 18	SEC ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
1049:16E (PC)		2,292	2,735	2,584

ES 2 720 363 T3

		4Dx®	Absorbancia a 650 nM		
	Muestra	Resultado	SEQ ID NO: 18	SEC ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
	3818:57B (NC)		0,051	0,065	0,045
EC+	HP 127	0,07	0,042	0,050	0,038
EC+	HP 143	0,08	2,867	2,825	2,731
EC+	HP 147	0,09	2,370	2,661	2,658
EC+	HP 151	0,21	2,176	2,093	2,535
EC+	HP 161	0,18	1,708	2,178	2,551
EC+	HP 165	0,08	2,690	2,492	2,525
EC+	HP 172	0,07	0,229	0,902	2,197
EC+	HP 185	0,38	2,497	2,622	2,704
EC+	HP 186	0,26	2,899	2,979	2,794
EC+	HP 188	0,40	2,482	2,578	2,898
EC+	HP 190	0,21	2,484	2,534	2,632
EC+	HP 192	0,18	1,473	2,132	2,526
EC+	HP 194	0,43	2,583	2,429	2,539
EC+	HP 197	0,22	2,150	2,239	2,537
EC+	HP 201	0,36	2,449	2,472	2,519
EC+	HP 206	0,10	2,477	2,247	2,549
EC+	HP 207	0,08	2,030	2,359	2,369
EC+	HP 209	0,20	0,262	0,218	1,102
EC+	HP 213	0,21	1,471	1,662	2,406
EC+	HP 215	0,19	2,144	2,431	2,721
EC-	HP 116	0,02	0,110	0,065	0,070
EC-	HP 119	0,02	0,102	0,091	0,079
EC-	HP 120	0,01	0,058	0,063	0,045
EC-	HP 121	0,02	0,054	0,064	0,057
EC-	HP 122	0,03	0,053	0,059	0,040
EC-	HP 124	0,02	0,055	0,061	0,052
EC-	HP 128	0,02	0,068	0,072	0,054
EC-	HP 129	0,02	0,056	0,057	0,044
EC-	HP 130	0,01	0,049	0,048	0,039
EC-	HP 131	0,01	0,051	0,053	0,043
EC-	HP 132	0,03	0,057	0,061	0,038
EC-	HP 134	0,02	0,059	0,084	0,114
EC-	HP 137	0,03	0,043	0,046	0,037
EC-	HP 138	0,01	0,055	0,063	0,048
EC-	HP 139	0,01	0,064	0,062	0,056
EC-	HP 140	0,00	1,574	2,444	2,491
EC-	HP 142	0,02	0,065	0,068	0,069
EC-	HP 144	0,02	0,080	0,079	0,081

		4Dx®	Absorbancia a 650 nm		
	Muestra	Resultado	SEQ ID NO: 18	SEC ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
EC-	HP 145	0,01	1,564	1,934	2,095
EC-	HP 148	0,01	0,037	0,043	0,043

Tabla 6 Muestras de campo positivas y negativas para *E. canis* sometidas a prueba utilizando el ensayo directo de formato de placa de microtitulación construido utilizando péptidos P140 (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

			Absorbancia a 650 nm		
Muestra		3Dx® SNAP S-Bkg	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
1049:16E (PC)		0,72	2,753	2,079	2,018
3818:57B (NC)		Neg	0,034	0,035	0,036
1049:16A	<i>E. canis</i> pos	0,28	0,201	0,173	1,448
1049:16G	<i>E. canis</i> pos	0,50	0,034	0,034	0,039
1049:16Q	<i>E. canis</i> pos	0,39	2,308	1,933	2,151
1049:16U	<i>E. canis</i> pos	0,56	0,627	2,038	2,254
1061:03B	<i>E. canis</i> pos	0,49	0,083	0,338	0,889
1061:03I	<i>E. canis</i> pos	0,27	2,766	2,593	1,646
1177:21D	<i>E. canis</i> pos	0,15	0,042	0,046	0,126
1177:21G	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,087	1,675	1,835
1177:21K	<i>E. canis</i> pos	0,34	0,681	1,930	2,010
1177:63O	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,146	0,112	1,587
1183:85A	<i>E. canis</i> pos	0,49	2,768	2,757	2,476
1256:311	<i>E. canis</i> pos	0,23	0,044	0,086	0,143
813:91F	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,239	1,570	1,993
813:91I	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,212	0,517	1,646
EC 10	<i>E. canis</i> pos	0,37	0,236	0,302	0,465

5

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de una infección natural era reactivo a los péptidos sintéticos derivados de la Proteína P140 de *E. canis*. (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

10 **Ejemplo 10: Prueba de sueros de perros positivos y negativos para *E. canis* conocidos que utilizan un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) obtenidos de la proteína p16 de *E. canis*. Los ensayos se realizaron utilizando el formato de ensayo indirecto haciendo uso del producto conjugado con HRPO anti-canino como indicador**

15 Se obtuvieron sueros de seis cánidos positivos para anticuerpos contra *E. canis* y tres negativos para anticuerpos contra *E. canis* de Sinclair Research (Columbia, MO). Se encontró que las muestras de suero eran positivas o negativas al realizar pruebas utilizando la prueba de ensayo de unión cromatográfica de flujo reversible con licencia IDEXX SNAP® 4Dx® para anticuerpos contra *E. canis*. Los resultados del ensayo SNAP® cromatográfico de flujo reversible se muestran en la Tabla 7.

20 Las muestras se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparados con péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) derivados de la proteína de superficie p16 de *E. canis*. El péptido sintético se inmovilizó en pocillos de microtitulación Immulon a 0,25 ug/ml (SEQ ID NO: 22 y 23, o a 0,5 ug/ml (SEQ ID NO: 24)). Se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un producto conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO) anti-especie, en este caso canina, (dilución 1:2.000), lavado y adición de sustrato de HRPO. Se determinó la absorbancia a 650 nm (A650) del fluido en pocillos

de microtitulación individuales utilizando un lector de placa de microtitulación.

Resultados:

Los resultados para muestras positivas y negativas se muestran en la Tabla 7. Las muestras positivas HP-319, HP-322, HP-326, HP-342, HP-354, HP-358 fueron reactivas a las secuencias de péptidos mostradas en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24. Las muestras negativas HP-302, HP-303 y HP-306 no fueron reactivas a las secuencias peptídicas mostradas en SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24.

Conclusiones:

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de una infección natural fue reactivo a los péptidos sintéticos derivados de la proteína p16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) en el formato de ensayo indirecto descrito anteriormente.

Tabla 7: Resultados de los ensayos para muestras caninas positivas y negativas utilizando pocillos de microtitulación recubiertos con péptido sintético de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) y producto conjugado anti-especie como indicador. A650 es la absorbancia a 650 nm. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo de cromatografía de flujo reversible SNAP® 4Dx®.

Muestra	Resultados de la placa (A650)						
	4Dx	SEQ ID NO: 22		SEQ ID NO: 23		SEQ ID NO: 24	
	SNAP	A650	Resultado	A650	Resultado	A650	Resultado
1049:16E (PC)	pos	1,733	pos	2,309	pos	1,943	pos
3818:57B (NC)	neg	0,046	neg	0,044	neg	0,041	neg
HP-319	pos	1,274	pos	1,765	pos	0,755	pos
HP-322	pos	1,247	pos	1,996	pos	0,692	pos
HP-326	pos	1,656	pos	2,159	pos	0,991	pos
HP-342	pos	0,704	pos	1,480	pos	0,277	pos
HP-354	pos	1,220	pos	1,745	pos	0,573	pos
HP-358	pos	1,890	pos	2,270	pos	0,342	pos
HP-302	neg	0,043	neg	0,043	neg	0,032	neg
HP-303	neg	0,036	neg	0,039	neg	0,029	neg
HP-306	neg	0,044	neg	0,039	neg	0,039	neg

Ejemplo 11: Prueba de sueros de perros positivos y negativos para *E. canis* conocidos utilizando un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) derivados de la secuencia de la proteína p16 de *E. canis*. Los ensayos se realizaron utilizando el formato de ensayo directo haciendo uso del péptido marcado con HRPO como indicador

Se obtuvieron sueros de siete cánidos positivos para anticuerpos de *E. canis* y tres negativos para anticuerpos de *E. canis* de los perros de campo. Se encontró que las muestras de suero eran positivas o negativas mediante el uso de la cromatografía de flujo reversible autorizada IDEXX SNAP® 3Dx® para anticuerpos contra *E. canis*. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 8.

Las muestras se sometieron a prueba utilizando un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado con los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) derivados de la proteína de superficie P16 de *E. canis*. Los péptidos sintéticos se inmovilizaron en pocillos de placas de microtitulación a 1 µg/ml. Se conjugaron cantidades separadas de los péptidos sintéticos con el reactivo indicador peroxidasa de rábano picante (HRPO). La muestra de prueba y el producto conjugado de péptido:HRPO (1 µg/ml) se añadieron al pocillo de microtitulación recubierto con péptido, que se incubó y se lavó. El anticuerpo de muestra unido al péptido inmovilizado y el producto conjugado de péptido:HRPO se inmovilizaron en el pocillo de microtitulación. Este complejo se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato de HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación.

Resultados:

Los resultados para las muestras positivas y negativas se muestran en la Tabla 8. Las muestras positivas 813:911,

1049:16A, 1049:16U, 1061:031, 1177:21G, 1177:21K y 1177:63O fueron reactivas a las secuencias de péptidos mostradas en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24. Las muestras negativas 3818:57A, 3818:57C y 3818:57D no fueron reactivas a las secuencias peptídicas mostradas en SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24.

5 **Conclusiones:**

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de una infección natural era reactivo a los péptidos sintéticos derivados de la proteína p16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) en el formato de ensayo directo descrito anteriormente.

10 **Tabla 8: Resultados del ensayo para muestras de campo caninas positivas y negativas utilizando pocillos de microtitulación recubiertos con péptidos sintéticos de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) y productos conjugados de péptidos sintéticos de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24) como indicadores. A650 es la absorbancia a 650 nm. La columna "3Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo de cromatografía de flujo reversible SNAP® 3Dx®.**

	3Dx	Resultados de la placa (A650)					
		SEQ ID NO: 22		SEQ ID NO: 23		SEQ ID NO: 24	
Muestra	SNAP	A650	Resultado	A650	Resultado	A650	Resultado
1049:16E (PC)	pos	2,497	pos	2,908	pos	1,367	pos
3818:57B (NC)	neg	0,038	neg	0,041	neg	0,056	neg
813:91I	pos	1,244	pos	1,828	pos	0,651	pos
1049:16A	pos	0,547	pos	0,819	pos	0,116	pos
1049:16U	pos	2,653	pos	3,531	pos	1,031	pos
1061:03I	pos	0,665	pos	1,801	pos	0,127	pos
1177:21G	pos	1,484	pos	2,353	pos	0,444	pos
1177:21K	pos	2,612	pos	3,049	pos	1,077	pos
1177:63O	pos	0,290	pos	2,091	pos	0,215	pos
3818:57A	neg	0,039	neg	0,037	neg	0,041	neg
3818:57C	neg	0,038	neg	0,036	neg	0,042	neg
3818:57D	neg	0,037	neg	0,037	neg	0,040	neg

15 **Ejemplo 12: Resultados de ensayos para sueros de 6 perros infectados experimentalmente con *E. canis* utilizando placas de microtitulación recubiertas con péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 23) y producto conjugado anti-canino como indicador**

20 Se infectaron experimentalmente seis perros no sometidos a tratamiento previo con el producto aislado de Louisiana de *E. canis*. Las muestras de suero se obtuvieron los días 3, 7, 10, 13, 17, 21, 24, 28 y 35 después de la infección. Las muestras se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparados con el péptido sintético p16-2 (SEQ ID NO: 23) derivado de la Proteína de superficie p16 de *E. canis*. El péptido sintético se inmovilizó en pocillos de microtitulación, se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un producto conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) anti-canino (dilución 1:2.000), lavado y adición de sustrato de HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación.

Resultados:

30 Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 9. Los 6 perros se convirtieron de un estado negativo a un estado positivo después de una infección experimental, según lo medido por el ensayo cromatografía de flujo reversible SNAP® 4Dx® disponible en el mercado. Los sueros de todos los perros reaccionaron con el péptido p16 de *E. canis* mostrado en SEQ ID NO: 23 en diversos momentos posteriores a la infección. Los tiempos entre la infección experimental y la reacción inicial al péptido de SEQ ID NO: 23 fueron los siguientes: Perro 108532, 17 días después de la infección; Perro 115853, 13 días después de la infección; Perro 265006, 17 días después de la infección; Perro 268830, 13 días después de la infección; Perro 285307, 13 días después de la infección y Perro 533573, 13 días después de la infección.

Conclusiones:

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de una infección experimental fue reactivo al péptido sintético derivado de la proteína p16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 23).

5 **TABLA 9. Resultados de los ensayos utilizando suero de perros infectados experimentalmente utilizando placas de microtitulación recubiertas con péptido sintético de *E. canis* (SEQ ID NO: 23) y producto conjugado anti-especie como indicador. A650 es la absorbancia a 650 nm. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo de cromatografía de flujo reversible SNAP® 4Dx®**

Canino	Muestra	Punto temporal	4Dx SNAP EC	SEQ ID NO: 23	
				A650	Resultado
	1049:16E	PC		2,253	+
	21172M	NC		0,035	N
		Corte		0,070	
108532	E1-0	d3	Neg	0,034	N
	E1-1	d7	Neg	0,035	N
	E1-2	d10	Neg	0,037	N
	E1-3	d13	Neg	0,069	N
	E1-4	d17	Neg	1,501	+
	E1-5	d21	Neg	1,662	+
	E1-6	d24	+(0,04)	1,572	+
	E1-7	d28	+(0,06)	1,604	+
	E1-8	d35	+(0,10)	2,056	+
115853	E2-0	d3	Neg	0,034	N
	E2-1	d7	Neg	0,033	N
	E2-2	d10	Neg	0,039	N
	E2-3	d13	Neg	1,246	+
	E2-4	d17	Neg	1,393	+
	E2-5	d21	Neg	1,227	+
	E2-6	d24	+(0,04)	1,549	+
	E2-7	d28	+(0,03)	1,580	+
	E2-8	d35	+(0,04)	1,939	+
265006	E3-0	d3	Neg	0,042	N
	E3-1	d7	Neg	0,035	N
	E3-2	d10	Neg	0,038	N
	E3-3	d13	Neg	0,052	N
	E3-4	d17	Neg	0,944	+
	E3-5	d21	Neg	1,031	+
	E3-6	d24	Neg	0,962	+
	E3-7	d28	Neg	0,840	+
	E3-8	d35	+(0,05)	1,303	+
268830	E4-0	d3	Neg	0,037	N
	E4-1	d7	Neg	0,034	N
	E4-2	d10	Neg	0,038	N

Canino	Muestra	Punto temporal	4Dx SNAP EC	SEQ ID NO: 23	
				A650	Resultado
	E4-3	d13	Neg	0,112	+
	E4-4	d17	Neg	1,432	+
	E4-5	d21	+ (0,05)	1,364	+
	E4-6	d24	+ (0,05)	1,167	+
	E4-7	d28	+ (0,09)	1,412	+
	E4-8	d35	+ (0,12)	1,986	+
285307	E5-0	d3	Neg	0,036	N
	E5-1	d7	Neg	0,046	N
	E5-2	d10	Neg	0,044	N
	E5-3	d13	Neg	1,018	+
	E5-4	d17	Neg	1,597	+
	E5-5	d21	+ (0,05)	1,478	+
	E5-6	d24	+ (0,04)	1,282	+
	E5-7	d28	+ (0,04)	1,329	+
E5-8	d35	+ (0,10)	1,838	+	
533573	E6-0	d3	Neg	0,037	N
	E6-1	d7	Neg	0,035	N
	E6-2	d10	Neg	0,032	N
	E6-3	d13	Neg	0,909	+
	E6-4	d17	Neg	1,832	+
	E6-5	d21	+ (0,08)	1,883	+
	E6-6	d24	+ (0,08)	1,964	+
	E6-7	d28	+ (0,06)	1,963	+
	E6-8	d35	+ (0,15)	2,166	+

Ejemplo 13: Preparación de *E. canis* inactivada con formalina para la inmunización en perros

Se hizo crecer *E. canis* en cultivo de células caninas utilizando métodos descritos en la bibliografía. Véase Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol. 42:362-368. Utilizando microscopía óptica, se estimó que más de 80% de las células O30 eran infectadas por *E. canis*. Se recogieron dos litros de cultivo celular infectado por *E. canis*, se centrifugaron y el sedimento conservado produjo 7,31 g de material (peso húmedo). Se presume que el agua representa hasta 80% del peso del material, lo que da un peso seco estimado de 1,462 gramos (20% del peso del material). El sedimento celular se resuspendió a 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 HT50-1-2 Solución de Formalina al 10%, tampón neutro) para una concentración final de formaldehído de 0,04%. La solución se agitó de 12 a 24 horas a 4°C. La mezcla inactivada se centrifugó y se conservó el sedimento celular. El sedimento se lavó por resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recogió por centrifugación y el lavado se repitió una vez.

La muestra se dividió en alícuotas en 73 viales con tapón de rosca y se congeló a -80°C. Cada vial contiene 20 mg (peso seco) de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina, adecuado para combinar con el coadyuvante apropiado para la inmunización en animales.

Ejemplo 14: Preparación de *E. canis* inactivada con formalina con dos coadyuvantes diferentes y protocolo para la inmunización de perros beagle con antígeno de *E. canis*

Para la inmunización en perros alojados en las perreras (perros beagle de laboratorio) se formuló el antígeno *E. canis* inactivado con formalina utilizando tres coadyuvantes diferentes. El antígeno de *E. canis* inactivado con formalina se

5 preparó con coadyuvante Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina (peso seco). Se preparó una formulación adicional de inmunógeno utilizando una combinación del coadyuvante Ribí (descrito anteriormente) y el coadyuvante BCG (1 mg por dosis) (Calbiochem de EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA). Dos grupos que consistían en tres perros cada uno recibieron dosis 4 veces durante un período de 170 días (días 0, 14, 156, 170) utilizando *E. canis* inactivada que contenía coadyuvante Ribí solo o coadyuvante Ribí y coadyuvante BCG combinados. En un esfuerzo por producir un estado hiperinmunitario inducido por la vacuna, todos los perros recibieron una dosis única (día 247) de *E. canis* inactivada con formalina formulada utilizando el coadyuvante TiterMax® (CytRx Corp., Norcross, GA) o el coadyuvante TiterMax® y el coadyuvante BCG combinados, siguiendo las instrucciones del fabricante. A los 10 perros se les administraron vacunas de acuerdo con el siguiente calendario:

ID perro	Vacuna administrada / Día de vacunación			
	<i>E. canis</i> / Ribí	<i>E. canis</i> / Ribí + BCG	<i>E. canis</i> /Título Max	<i>E. canis</i> /Título Max + BCG
CVYDEH	0, 14, 156, 170		247	
CWMBDC	0, 14, 156, 170		247	
CVXCSM	0, 14, 156, 170		247	
CWMAXK		0, 14, 156, 170		247
CVSCVA		0, 14, 156, 170		247
CVXCAP		0, 14, 156, 170		247

15 El comité IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de los perros beagle de laboratorio. A todos los perros se les administró el artículo de prueba apropiado en forma subcutánea en el área dorsoescapular. El día 0, se encontró que los 6 perros eran seronegativos utilizando tanto el diagnóstico por cromatografía de flujo reversible SNAP® 3Dx® como el análisis de transferencia Western utilizando el organismo *E. canis*. Los seis animales fueron seroconvertidos a una prueba positiva en el ensayo de cromatografía de flujo reversible SNAP®3Dx® para *E. canis* el día 42. Las muestras de sangre de producción se tomaron los días 226, 261, 268 y 282 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjeron aproximadamente 25 ml de suero).

20 **Ejemplo 15: Prueba de sueros de perros beagle inmunizados con *E. canis* inactivada con formalina (muestras de vacuna) utilizando un inmunoensayo basado en placa de microtitulación preparado utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24) obtenidos de la proteína p16 de *E. canis***

25 La preparación de *E. canis* inactivada con formalina y la inmunización de perros beagle se describieron en los Ejemplos 13 y 14. Las muestras de perros beagle inmunizados se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación directos preparados utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24).

Formato de ensayo directo

30 Las muestras se sometieron a prueba utilizando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparados utilizando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24). Los péptidos sintéticos se inmovilizaron sobre pocillos de placas de microtitulación a 1,0 µg/ml. Se conjugaron cantidades separadas de los péptidos sintéticos con el reactivo indicador peroxidasa de rábano picante (HRPO). La muestra de prueba y el péptido/indicador del inmunoensayo se agregaron al pocillo de microtitulación recubierto con péptido, que se incubó y se lavó. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado y el péptido/reactivo indicador se inmovilizaron en el pocillo de microtitulación. Este complejo se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato de HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación.

35 **Resultados**

40 Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 10. El control positivo (PC, ID 1049: 16E) y el control negativo (NC, 3818: 57B) eran muestras de suero positivas y negativas para *E. canis* conocidas, respectivamente. Todas las muestras se sometieron a prueba utilizando la prueba cromatográfica de flujo reversible SNAP® 4Dx® disponible en el mercado para anticuerpos contra *E. canis*. Los resultados para muestras temporales secuenciales de los 6 perros (CVYDEH, CWMBDC, CVXCSM, CWMAXK, CVSCVA y CVXCAP) que recibieron el antígeno de *E. canis* inactivado con formalina utilizando diferentes coadyuvantes se muestran para el día 226, el día 261, el día 268 y el día 282 después de la inmunización. Los resultados de la prueba de cromatografía de flujo reversible SNAP® 4Dx® demuestran que se indujo una respuesta de anticuerpos en los animales vacunados. Ninguna de las muestras de suero de los animales vacunados fue reactiva en el ensayo en formato de placa de microtitulación con péptido (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24).

TABLA 10. Resultados del ensayo utilizando suero de perros inmunizados con antígeno de *E. canis* inactivado con formalina medido utilizando placas de microtitulación recubiertas con péptido sintético de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24) utilizando producto conjugado de péptido sintético como indicador. DO es la densidad óptica. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo de cromatografía de flujo reversible SNAP® 4Dx®

5

Coadyuvante	Muestra	DO 4Dx SNAP/ (resultado)	Resultados de la placa					
			SEQ ID NO: 22		SEQ ID NO: 23		SEQ ID NO: 24	
			DO	RESULTADO	DO	RESULTADO	DO	RESULTADO
	1049:16E (PC)	0,72	2,276		2,865		1,021	
	3818:57B (NC)	neg	0,043	neg	0,044	neg	0,042	Neg
Ribi	CVYDEH día 226	neg	0,038	neg	0,056	neg	0,037	Neg
	día 261	0,07 (pos)	0,037	neg	0,046	neg	0,035	Neg
	día 268	0,17 (pos)	0,045	neg	0,057	neg	0,038	Neg
	día 282	0,18 (pos)	0,035	neg	0,048	neg	0,034	neg
Ribi	CWMBDC día 226	0,08 (pos)	0,050	neg	0,052	neg	0,043	neg
	día 261	0,45 (pos)	0,044	neg	0,090	neg	0,039	neg
	día 268	0,40 (pos)	0,039	neg	0,064	neg	0,038	neg
	día 282	0,30 (pos)	0,038	neg	0,058	neg	0,040	neg
Ribi	CVXCSD día 226	neg	0,034	neg	0,038	neg	0,042	neg
	día 261	neg	0,044	neg	0,073	neg	0,071	neg
	día 268	0,14 (pos)	0,042	neg	0,038	neg	0,041	neg
	día 282	0,23 (pos)	0,044	neg	0,038	neg	0,054	neg
Ribi + BCG	CWMAXK día 226	0,07 (pos)	0,038	neg	0,035	neg	0,039	neg
	día 261	0,26 (pos)	0,043	neg	0,037	neg	0,036	neg
	día 268	0,36 (pos)	0,045	neg	0,043	neg	0,034	neg
	día 282	0,34 (pos)	0,038	neg	0,036	neg	0,034	neg
Ribi + BCG	CVSCVA día 226	0,10 (pos)	0,039	neg	0,036	neg	0,041	neg
	día 261	0,51 (pos)	0,041	neg	0,036	neg	0,036	neg
	día 268	0,45 (pos)	0,043	neg	0,035	neg	0,035	neg
	día 282	0,47 (pos)	0,036	neg	0,037	neg	0,036	neg
Ribi + BCG	CVXCAP día 226	neg	0,041	neg	0,036	neg	0,034	neg
	día 261	0,51 (pos)	0,054	neg	0,046	neg	0,047	neg
	día 268	0,42 (pos)	0,041	neg	0,045	neg	0,043	neg
	día 282	0,48 (pos)	0,035	neg	0,034	neg	0,036	neg

Conclusiones

Los resultados demuestran que los anticuerpos inducidos como resultado de la inmunización utilizando antígeno de *E. canis* inactivado con formalina fueron reactivos en la prueba cromatográfica de flujo reversible SNAP® 4Dx®, lo

que indicaría que se había iniciado una respuesta de anticuerpos anti-*E. canis*. Estas mismas muestras no eran reactivas a los péptidos sintéticos derivados de proteína P16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24).

- 5 Los sueros de perros inmunizados con antígeno de *E. canis* inactivado con formalina no eran reactivos a los péptidos derivados de la proteína P16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24). Los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24) no fueron reactivos al anticuerpo inducido como resultado de la vacunación.

Ejemplo 15: Control de tratamiento de infección por *E. canis*

- 10 Se infectaron seis perros experimentalmente con *E. canis*. Se administró doxiciclina a los 28 días de la infección. Se detectaron anticuerpos específicos para *E. canis* utilizando SEQ ID NO: 23 con un protocolo de ensayo indirecto. Los polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 23 se inmovilizaron sobre pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un producto conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO) anti-especie, anti-canino de conejo (dilución 1:1.000). La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación. El corte negativo fue 2 veces el valor de D.O. del control negativo.

- 15 Los resultados se muestran en la Figura 8. Los perros E-1, E-2, E-3, E-4, E-5 y E-6 se infectaron experimentalmente con *E. canis*, pero su infección no fue tratada. La Figura 8 demuestra que el nivel de anticuerpos que se unían a SEQ ID NO: 23 aumentaba considerablemente después de la infección experimental y no disminuía durante el transcurso del experimento. Los perros EDTx-1, EDTx-2, EDTx-3, EDTx-4, EDTx-5 y EDTx-6 se infectaron experimentalmente con *E. canis* y después se trataron con doxiciclina a los 28 días de la infección. La Figura 8 demuestra que el nivel de anticuerpos que se unían a SEQ ID NO: 23 aumentaba considerablemente después de la infección experimental y disminuía después de la administración de doxiciclina. Por lo tanto, SEQ ID NO: 23 se puede utilizar para controlar la progresión, la respuesta al tratamiento o la eficacia del tratamiento de la infección por *E. canis*.

- 25 **Ejemplo 16: Diferenciación de perros que han sido vacunados contra *E. canis* y perros que han sido vacunados contra *E. canis*, pero se han infectado con *E. canis*.**

- Las vacunas pueden no ser completamente eficaces para prevenir la infección. Por lo tanto, es deseable tener un método para determinar si un animal vacunado se ha infectado a pesar de la vacunación. Los inmunoensayos que utilizan p16 como agente de detección no detectan anticuerpos anti-*E. canis* en perros que han sido vacunados contra *E. canis* y que no están infectados por *E. canis*. Ahora se ha descubierto que una proteína p16 de *E. canis* (SEQ ID NO: 10) se puede utilizar para detectar la infección por *E. canis* en perros que han recibido una vacuna contra *E. canis*.

- 35 Seis perros que habían sido vacunados contra *E. canis* y dos perros no vacunados fueron sensibilizados con células K9 infectadas con *E. canis* en DMSO al 10%. Cada perro fue sometido a prueba a lo largo del tiempo para detectar anticuerpos anti-*E. canis* con un inmunoensayo que comprendía SEQ ID NO: 10. Todos los perros vacunados y los dos perros de control se infectaron con *E. canis*. Las infecciones por *E. canis* se confirmaron con dos marcadores de infección independientes. Los inmunoensayos fueron capaces de detectar la infección por *E. canis* en los perros vacunados y no vacunados. Todas las señales de inmunoensayo estaban significativamente por encima de las señales de fondo. Véanse las Figuras 9A-B, 10A-C y 11A-C.

Secuencias:

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

ORIGEN

```

1 ATGGATATTG ATAACAATAA TGTGACTACA TCAAGTACGC AAGATAAAAG TGGGAATTTA
61 ATGGAAGTGA TTATGCGTAT ATTAAATTTT GGTAATAATT CAGATGAGAA AGTAAGCAAT
121 GAAGACACTA AAGTTCCTGT AGAGAGTTTA CAACCTGCTG TGAATGACAA TGTAGGAAAT
181 CCATCAAGTG AAGTTGGTAA AGAAGAAAAAT GCTCCTGAAG TTAAAGCGGA AGATTGCAA
241 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
301 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
361 GGTAGTATAG AACATTTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTAAAAC TAGTAAAGAG
421 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTGGAA
481 CATTTCATCA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAACTA GTAAAGAGGA AAATACTCCT
541 GAAGTTAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
601 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TAAAAGTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCA

```

ES 2 720 363 T3

```

661 GAAGATTTGC AACCTGCTGT AGATGATAGT GTGGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
721 AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG
781 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT GGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGAGAAAA AGTATCTAAA
841 ACTAGTAAAG AGGAAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
901 GATAGTGTGG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAG
961 GAAAATACTC CTGAAGTTAG AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGG TAGTGTAGAA
1021 CATTATCAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAGTACTCCT
1081 GAAGTAAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATAGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
1141 GAAGTTGGGA AAAAAGTATC TGAAACTAGT AAAGAGGAAA GACTCTCTGA AGTTAAAGCA
1201 GAAGATTTGC AACCTGCTGT AGATGGTAGT GTAGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
1261 AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG AAAGTATCTG
1321 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGAGAAAA AGTATCTGAA
1381 ACTAGTAAAG AGGAAAATAC TCCTGAAGTT AAAGCGGAGG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
1441 GGTAGTGTAG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAA
1501 GAAAGTACTC CTGAAGTTAG AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTAGAA
1561 CATTATCAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAGTACTCCT
1621 GAAGTAAAAG CGGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTGTGGAACA TTCATCAAGT
1681 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TGAGACTAGT AAAGAGGAAA GACTCTCTGA AGTTAAAGCG
1741 GAAGTACAGC CTGTTGCAGA TGGAATCCTT GTTCTTTTAA ATCCTATGCC TTCATTTGAT
1801 AATATTGATA CTAATATAAT ATTCCATTAC CATAAAGACT GTAAAAAAGG TTCAGCTGTA
1861 GGAACAGATG AAATGTGTTG TCCTGTATCA GAATTAATGG CTGGGGAACA TGTTATATATG
1921 TATGGAATTT ATGCTCTATG AGTTCAATCA GTAAAGGATT TAAGTGGTGT ATTTAATATA
1981 GATCATTCTA CATGTGATTG TAATTTAGAT GTTTATTTTG TAGGATACAA TTCTTTTACT
2041 AACAAAGAAA CAGTTGATTT AATATAA

```

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

ORIGEN

```

1 MDIDNNVTT SSTQDKSGLN MEVIMRILNF GNNSDEKVSN EDTKVLVESL QPAVNDNVGN
61 PSSEVGKEEN APEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGKVVSE TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
121 GSIEHSSSEV GEKVSKTKE ESTPEVKAED LQPAVDDSV EHSSEVGEKV SETSKEENTP
181 EVKAEDLQPA VDSIEHSSS EVGEKVSKTS KEESTPEVKA EDLQPAVDDS VEHSSSEVGE
241 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
301 DSVEHSSSEV GEKVSETSKE ENTPEVRAED LQPAVDDSV EHSSEVGEKV SETSKEESTP
361 EVKAEDLQPA VDSIEHSSS EVGKVSSETS KEESTPEVKA EDLQPAVDGS VEHSSSEVGE
421 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS TSKEENTPEV KAEDLQPAVD
481 GSVEHSSSEV GEKVSETSKE ESTPEVKAED LQPAVDDSV EHSSEVGEKV SETSKEESTP
541 EVKAEDLQPA VDSVEHSSS EVGEKVSSETS KEESTPEVKA EVQPVADGNP VPLNPMP SID
601 NIDTNIIFHY HKDCKKGSV GTDEMCCPV ELMAGEHVHM YGIYVYRVQS VKDLSGVFHI
661 DHSTDCNLD VYFVGYNSFT NKETVDLI.

```

5 SEQ ID NO: 3 Secuencia de nucleótidos del antígeno de 200 kDa desde 1081 hasta el final

ORIGEN

```

1 AATTTAGAT TTTGGACTTG TAGATGGAGA TGGTAAAAAT CCTTTACATC ATGCTGTTGA
61 ACATTTGCCA CTGTTATAC TTAAGGGCGT AATGGACCAT GTAAAAAATA GTAGTGAGTT
121 TCAAGATTTA GTAAATGATC CTGATTATTT TGGAAATACT ATAGCTCATT ATGCAGTTAA
181 GAATAAAAAAT GCTGATTTAA CATTGTTTAA CATGCTGAAA GCTTCAGGAG CTGATTTAAA
241 TGTTAGGAAT GTAGTTGGTC GAGCTCCAAT ACATGTTGCT TCTTCTAATG GTAAGGCTAA
301 TGCAAGTTCT GGACTTGTAT CATGTGGTAT TGACGTTAAT TCTCAAGATG TGAATGGAGA
361 TACACCACCT CATATTGCTG TTGAAGGCGG TAGTATGGAG ACGGTATTAG CAGTGTAAA
421 TCAGAGAGGT GCTGATGTTA GTGTCCAGAA TAACGATGGA GTTACACCTA TGCTTAGTGC
481 TGCTAAATAT GGAGATATAG GTGTAATAAA AGCTTTAGGT TCAGCTAAAC CAAATATTAA
541 AGGTGAAGAC ACTGTTGCTA AATCATTGCT GATGGAGGAT TACAAAGGTT TTACACCCTT
601 GCATTTTGTA GCTGGTGGTG GTAGCAGAGA TACATTCCGT GTCGTAAGAA AAAATTATGA
661 AAAATGTCAT GACTTAGCTA CTATTAGGGC AGCTTTAATG CAAGATAGAA GTGGTGGTGA
721 GCTTGTAAT TTAGGGGATT TTGAAAGTGA AAATATATTG GGTTCGCCAA ATGCAAAAT
781 CTTGCAGCAT ATTCAATCAG CAAATTTTGG TTTTCTCCA GCGCATTGTG CTATAGTATC
841 CTCTAATCAC AATGTAATGA AAGATATCTT AAATTTTGTG GGGGATTCGT TACACCTACC
901 AAGTGAGCGT GGGTATAATG CAATGCAGGT TGCTGCTTTG TTTGGTGACA AAGAAGCAGT
961 GAAAATGCTT GCTAAAAGTG CTAAGCCAAG TGATCTTAAT TTTAAGACTT CAGCAACTCC
1021 TACTCCGTTA AATCTTGAT GTCTTAGAGG TGATAATGAG GTAGTACGTT GGTTAGTAGG
1081 TCAACATGGT ATTGACATTA ACCAACGTAT GGGAAAGTAT AAAAACACTG TATTGCATTA
1141 TGCAATCAGC AAAGGAGATA GTTTCTTGTG GCAAAGATA TTAGCTCATA CTGGAGTTGA

```

ES 2 720 363 T3

```

1201 TGTTAATTGT GAGAATAACC TAGGTCAAAC GCCTTTACAT TTAGCAGTTG AGGGAGGAGA
1261 TCCTAAGATA GSTATCTTCTC TTCTTAAAGC TGGTGCAGTA GTTAATCGTC TGGATGATAA
1321 TGGTAGATCT GTACTTTCTT CTGCGATAGT TCCAGGTAGA AAAGAAAAGG GAGTGCTGGG
1381 TATAGTTAAT AAATTGGCTGG ATAGAGGTGC AGATATTAAT TTAGATGGAG ACCACAATAT
1441 ACTTTTTGAT CAGTGTCTAA GGGGTGGATA TAATAATGTA TTAGATAAGT TAATACAACA
1501 AGGGGTGGAA GTTAATCGAA ATAGTGAAAT ACGTCCAATG GTTTATGCTG CAATATCTGG
1561 TAATGAGCAT GCTATCAAAT CATTAGCTAA TGCTGGTGA GATGTTAATG AAGTAGTAAA
1621 TAATCCATCT AGTAGGCATT CAGGAAATCC TTTAATTATG GTTGCAGTAG CAGATGGTAA
1681 TGCAGGCTCT CTTAAAAAT TAGTTTCTGA AGGATGTGAT GTTGGTAAAT CTGGAAAAGA
1741 TGGTAATACA GCGTTACATT ATGCTGTTAG TCATTCAGAT AAAGAGTTTG GTAATAAAGC
1801 TATAAAGATA TTAATTTTAC GTAATAGTGT TGGGACTAAT AGAGATATTC TTACTCAAAA
1861 GAATAACGCA GGTGATACAC CTTTACATGA AGCTCTTAAG TCAGGTAATA TTAATCTGT
1921 ACAGAATATC TTAAGTCTG TACATCCAAG ATACGCAAAG GAGATATTA CAGCCAGAGA
1981 CAAAGAAGGG TACACACCAA TGCATTATAC TGTGGAGTA AATAATGTTG ATGTTGGTAG
2041 AAGTATCTTA GAGTCTATGC TCTCTAAAGG TGTGAATAAT CTGGAGAGA TTGTTGGAGC
2101 ACAGGATAGT AATTTTCGAA CACCTCTGCA TGCTGCTATT AAAATATCTG ATTATCGTGC
2161 TGCGGACATG ATAATAGGTA GCTTATCGAA AACAGAAATG TCAAAGTTAT CGCAATTAAC
2221 AGATATTAAC GGGGATACAC CACTACATCT TTCTTGTCTG TCTGGTAATG TCGAGATGAC
2281 ACAATTCCTT CTTGGAGTT TGGATAAAGC TGAATTACCT AAGACATTA AGATAGCAAA
2341 TAAAAATGGA GATACTCCTT TACATGATGC TATAAGAAAT GATGATATTA AATCTGCAAA
2401 AATGATGATT AGGAATTGTA ACAAAGAAAG ACTTGCTAAT GTATTAATAA GTAAGATAG
2461 TTTTGGTAAT ACAGTATTGC ATACTATTGC TGACCAAGTT ATTGCGAATC CAGAATCAAA
2521 GAAAGACCTT GATGGTTTGA TGAATTTAGC AGTGAAAAGG CTAAGAATAA AAGATCTGAA
2581 AGATCTAGTT AATACGCGAA ATAACCTCTGA CGATACTGTT GCACATTGTG CTCTTTTATC
2641 GGATATGAAA TATGCTCAAA AGATACTTAA ATCATGTAAC CATGATACAT TAGTGAGAGG
2701 AAATAGTAAT AATCAATCTT TATCAGAGTG TATTCGTGAT GATAGTAAAT ATAAAAAAGG
2761 TGGAAATTTT AGTAAGTCTT TATTTTCAAA ATTAAGAAA CTTGAGGCAC GAGCTGCCAG
2821 CGCTAGTTAT GAAGAATTAT CTAGTATCAG TAGTGGTAGT GATGTTCTT CTGTATCAAC
2881 AAATAGCACA GAAGTAAGTG CAGTACCTGA AGTGGCAAGA AGTAGTGGT CTGTGCTGTT
2941 CAAACATGTG CAAGAAACAG GAGTTGACAC GTCTGGTCTT TCTGATATAG AAAGTTTAGA
3001 GAGATTATCT GATACTAGTC TTGGGTCAA TGATTTTGT CAGCGAATGG CAGATTTAGA
3061 TCAAGAAATA GCAAATATT TTAGTGGTTT ACCAGAAGTT ACCCAGGTAG CTGTAAGTCA
3121 ACAACAAGCA GCATCTCCTA GTTCAGGTCA AGCTGCTGGT GTGCAACAAA AAGAGATGCA
3181 GAGATAA

```

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

ORIGEN

```

1  NLDVFLVVDG GKNPLHHA VE HLPPVILKGV MDHVKNSEF QDLVNDPDYF GNTIAHYAVK
61  HKHADLTLFN MLKASGADLN VRNVVGRAPI HVASSNGKAN AVSGLVSCGI DVNSQDVNGD
121 TPLHIAVEGG SMETVLAVLN QRGADVSVQN NDGVTPLMSA AKYGDIGVIK ALGSAKPNIK
181 GEDTVAKSLL MEDYKGFPL HFVAGGSRD TFRVVRKNIYE KCHDLATIRA ALMQDRSSGE
241 LVNLGDFESE NILGSPNAKF LQHIQSANFG FSPAHCIVS SNHNVMKDIL HFVGDLSLHP
301 SERGYNAMQV AALFGDKEAV KMLAKSAKPS DLNFKTSATP TPLNLACLRG DNEVVRGLVG
361 QHGIDINQRM GSDKNTVLHY AISKGDSFLV QKILAHTGVD VNCENNLGQT PLHLAVEGGD
421 PKIVSSLLKA GAVVNRLLDN GRSVLSAIV PGRKEKGLG IVNKLLDRGA DINLDGDHNI
481 LFDQCLRGGY NNVLDKLIQQ GVEVNRNSEI RPMVYAAISG NEHAIKSLAN AGGDVNEVVH
541 NPSSRHSGNP LIMVAVADGN AGLLKTIVSE GCDVKGSGKD GNTALHYAVS HSDKEFGNKA
601 IKILISRNSV GTHRDILTQK NNAGDTPLHE ALKSGNINSV QNILSAVHPR YAKEILTARD
661 KEYTPMHYT VGVNNDVGR SILEMLSKG VNILGEIVGA QDSNFRTPHL AAIKISDYRA
721 ADMIIGSLSK TELSKLSQLT DINGDTPLHL SCQSGNVEMT QFFLGLDKR ELPKTLKIAN
781 KNGDTPLHDA IRNDDIKSAK MMIRNCNKEE LANVLKCKDS FGNTVLHTIA DQVIANPESK
841 KDLDGLMNLA VKRLKNQDLK DLVNRNNSD DTVAHCALLS DMKYAQKILK SCNHDTLVRG
901 NSHNQSLSEC IRDDSKYKKG GIFSKSLFSK LKKLEAARAS ASYEELSSIS SSGSDVSSVST
961 NSTEVSAPVE VARSSGAVSF KHVQETGVD TSGPSDIESLE RLSDPTSLGSN DFDQRMADLD
1021 QEIANIVSGL PEVTQVAVSQ QQAASPSSGQ AAGVQKEMQ R.

```

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

ORIGEN

```

1  AATTATGCTG AAACACTTTT ATCATTGGT GAATCTCGAG CAGAAGGACG TGAATCTCCA
61  TCAAGTGCA TTTGTTCAAAC TGGTCAATCA GAAGTACCTC GGAGTGAGGC TGCAGAGCCA
121 TTAATTCAAT TTCTCATGA TGAAGAAAGT ACTGCATTAG GTTCTCAAGC AACTATGACA
181 GGAGTGCTA CTCAGGCTAG TCCGTCAGCA GCATATCAGG ATGATAGTGA AATATCACGT

```


241 ATGAGGTCTA TGGCAGGAAC ATCTGCTCAA GCTGATCAAT CAGCAGTACA TCGTCGGAGT
 301 GGTACAGCAT TAGAGCCATT AATTGAATTG CCTGATGAAG AAGAAAATGC TGCATTAGAT
 361 TTTCAAACAG CTATGACAGG AGTGCCACT ACTGCTAGTC CGTCAGCAGT ACATCGGAGT
 421 GGTGTTGCAT CAGATCCTAC GCTACCTGAT GATGAAAAGAA TTGATGTTCC ATCAGTTTCA
 481 TCTCAAGTTG TAAGACCTTT TAGTGATGGT GAAGATTATT CAGTATATGA TAAATCAGGT
 541 GTAGTAAGTG GTCATGAAA ACCTGTTTCT TCTAGAGATT CAAGACAATT GGATGCATTT
 601 GGTGATCCAT CAGATGATT ATTGCCGGAG AGTGAAATTA TTGTTAGCAG CAGTAAGAAA
 661 GCAATATTAG ATAGCCAAA TGAAATAGAA TCTCTTATC AGAGTGGAGA TACTTCTAGA
 721 TGTATTAGGG CAATTAATAG TGCTCCTAGT GCGTCAGTGT TTCAACTGAA GACTTTATCG
 781 AATGATATAT CTATTGCTGG ACCTGCTTTT TTAATGGTA ATATTGATTT 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 TAGATTAAT GATTTAGTAG AAGGGTTAAG TAGTTCGCAA
 1081 GTTGATCTTG AAGATGTTG TATTGATGAG TTTATGATCT CATTGTTAG TCATTCTAGA
 1141 ATGAGTGATC AAGCAGTAAA GAATATTGCT ACTGCGCAA ATGAGTTTTT TGCACGTGAT
 1201 TCTGTTTATA ATATTAGTCG TTTAGTTGAT ACTTCTATAG TTTTGCAGAA TAAATTCAGT
 1261 GAAGTATTTT ATGAAGTCTG TGGACGTATT TTATCTGAAG AAGCTGGTAA ACATAAGGGT
 1321 GTTGCTGAAG CAAATTATTC AAGATTGAAT AAAATATTAA ATGATGAATG TCTTAGAAAAG
 1381 ACTTTAGCTA ATACAGATGC CGATGGAAAT AATGTTTTAC AGAGATTGTG TCAAGATATT
 1441 GCTTCTGGAA AAATCAATGC TCGTGATGAC AGAGTATTAA AACTTTTTGA GACAAATTATA
 1501 TCTAATTTAA AAGACAAAGA TAAAGCATT A TAGAGGATT TATTATTTAA TAATAGAAAC
 1561 TCAAGATTTC AAAATTGCAT TGAAGCTATA CCAAGTATTC CTGGTGCCGA TGCTCTATT
 1621 AAAAAACTAG AAGAGTTATT ATTAAAAAAG AAAATAGCAG AGTCTTGTGA TTTTAATTCT
 1681 ATGTTAGTGA ATGTTGCTGA GTCTGCTAAT GATAATTTAT ATAATTACCT GCGCACTAAT
 1741 TATGCAGTTA TTGGTATAAA TAACGTAGAT ATAAATGGCA ATTCATCCCT ATGTAAGCT
 1801 GTTGTACTG GGTCAACAGG TATTGTTAAA GCAGTATTAT CAACTGGAAC TAATATTAAT
 1861 AGGAAAGATA AAAATGGTAA TACACCTTTA CATGCATTGT TAATTTTTAT GATGTCTAAC
 1921 CCTGAACCTG TCAAGGAGCA ACATATTTCA CTTGTGAAAT TCTTAGCGTC TCGTGGAGCT
 1981 TTACTTAATG TAAAAATAA TATGAATATT TCTCCAATTA TGCTTGACAG ATCTATTGAT
 2041 AAGAAAGAGG AACTTGCTAA GAAATTTACA AATCAAAAAG TTAGTATTTT AGAATCTTTA
 2101 ATAGCTGGTA GTGAAGAACA TTTAGGGCTT AAATCCAAT GTATATCTGA GTTAAAGCCT
 2161 TATATAGAAT TAGGAAAAGG CATGAAGTAC GAAGATATAC ATGCTGATGT AATAGGTGGT
 2221 GTATTATCTG CTGATATGTG TAATGCTAGA TTGCAGATAG GTAATTTATT AAATGGTGAT
 2281 TTTTGTAAAG AAAATGAATT AAAGACAGTA AAATTTAATT TTTCTGATAC AAATAAGGGT
 2341 TATGTACAAA ATGTTGGTAA AAAAGAAAT TAT

SEQ ID NO: 6 ATPasa - secuencia de la proteína del fragmento del clon 84

ORIGEN

1 NYAETTLSEF ESRAEGRESP SSFAVQTGQS EVPRSEAAEF LIQFPHDEES TALGSQATMT
 61 GVSTQASPSA AYQDDSEISR MRSMAGTSAQ ADQSAVHRRS GTALEPLIEL PDEEENAALD
 121 FQTAMTGVPT QASPSAVHRS GVASDPTLPD DERIDVPSVS SQVVRPFSDG EDYSVYDKSG
 181 VVSGHERPVS SRDSRQLDAF GDFSDDLLPE SEIIVSSSKK AILDSQNEIE SLIQSGDTSR
 241 CIRAINSAPS ASVFQLKTLN NDISIAGRAF LINGNIDLIEA CMNSGKLNLP NITDNEKNL
 301 LHQFVGYFER DPRMLLDAGM RNLFLRLCMD YGFDINHKNL NGNTVLDRLN DLVEGLSSSQ
 361 VDLESSGIDE FMSLLAHSR MSDQAVKNIA TAQNEFFARD SVYNISRLVD TSIVLQNKFS
 421 EVFVEYCGRI LSEEAGKHKG VAEANYSRLN KILNDECLRK TLANTDADGN NVLQRLCQDI
 481 ASGKINARDD RVLKLFETII SNLKDCKKAL LEDLLFNLRN SRFENCIEAI FRIPGADALF
 541 KKLEBLLKK KIAESCFDPS MLVNCAESAN DNLYNYLRTN YAVIGIHNVD INGNSSLCKA
 601 VVTGSQGIK AVLSTGTHIH RKDKNGTPL HALLIFMMSN PELVKEQHS LVKFLASRGA
 661 LLNVKNNMNI SPIMLAESID KKEELAKKFT NQKVSILESL IAGSEHLGL KSKCISELKP
 721 YIELGKMKY EDHADVIGG VLSADMCNAR LQIGKLLNGD FCKENELKTV KFNFSDTNKG
 781 YVQNVGKKRN Y

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

ORIGEN

1 GTAAAAAAT TAAGATTATT ATTAATTTCA ATAAGTGAGT TACCGCAAGA ATTAAAAGAT
 61 CAAATTTTAA GACTAGAAAG TACTATAGAT AAATTACGAA ATAGAATTAA TGCCTGCATA
 121 AAGTCTGACG ATAGAGAAGG TATTGCACAT GCTGTAGAAT CTATGGCTAG TTCTTATTGT
 181 GAATATTAG GACATTGTAG ATTAATTTTT AAGAAATTAT ATGATGAAA TGCTGATAAA
 241 AGTTTGTCTAG AATTATGTAT TAAAGAATAT CAATCTGATT TAAACAAATT ATTGGAACAA
 301 GGTATTGATA TATGTGCTTC AGAAGTCTCA TCAGAATGTA AGGATTAGT TTGTAAAGTA
 361 TGTGAAGATG AATTTGAGAA ATATGACTCT TTATCTAAAG TACAAAGATT CAGGGAATTA

ES 2 720 363 T3

```

421 TCTGGTGAAA TTGCTGATTT GGATGATAAA TTAACAAGAA GGGCTTCTTT TGTTGAGACT
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 TGTTGATGGC 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 TTGAAAGTTC TGGTGTAGT
1201 CAAGATGGTA TTACAACACC AGGACAACGT GTTGTGCAAG GTAAAGATGA TATACAATCT
1261 AGTGATAGTG ATAGTGATAG TAAATACGGT GATGATGATA GTAAAAAAGC ATCAGCTAGT
1321 GCACCTGCTG TTGACCAAGT TGTACCTGTA GCTGATGTTT AACCTGAACC TCAGCTAGGT
1381 GAAAAATTTG AAACATTAGA GTCTAGTATA ACTAAAGGAC CTGAGTTGCC TGGTGATGCA
1441 TCTACTGCTA AGCAATCTAT ACCTTTTTCG ATAACCCAT CAAGTCTCTGA GACAGTTGAT
1501 GAAAAACTTG AAAGTTCTGG TGTTAGTCAA GATGGTATTA CAACACCAGG ACAACGTGTT
1561 GTGCAAGGTA AAGATGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTAA ATACGGTGAT
1621 ACTGATAGTA AAAAAGCATC AGCTAGTGCA CCTGCTGTG ACCAAGTTGT ACCTTCTGAC
1681 ACTCGTGCCG ATGGAGTATC AGAACCATTA GCATCTCATG TGGATCAAGG ATCTGATGTA
1741 CCTGGTGATG CATCTGTGTA TGTTGTTGAT TTAAGATTAG GACGGTTATC TACTGAGCAA
1801 AGTGGATTGT TGCCACGTC TGAACAAAAT GTAAGAGCAT TTATTTTAGA ACAGAGTTTG
1861 TTAGATCAAT TATATATGGA CTATATAGAT TTACACCTCG ATCAGAAAAG TTGTGAAGCT
1921 TATAATTCAG CATTGCATGG ATATAATACA AGATTAGAGT TACAGAAGGA ATATAACAGG
1981 ATTTTGAAT CACATGAATC AGCATCTCCA AATGAAATTA ATAGTTTTC ACAAAAATAT
2041 AGAGCAGCAT TAAGAGATGT TGCGCAGGAT ATTGTTAATC AGGGTCCAAT GTTTTATTCT
2101 TCTAGAGATG CAATGCTATT AAGGGCTAGA GTAGACACAT TGTGTGATAT GTGTGCTTCA
2161 ATACGTAATC TGTATATGGT TGAATTAGAT GCCATAGATA AAGAAGAAAA ATCGTTACAA
2221 TCTGATATGA AATCTGCAAG TTCTAGTGAT AAAAAGTTGA TACAAGAAAA AATAAAATTA
2281 CTT

```

SEQ ID NO: 8 ATPasa - Secuencia de la proteína del fragmento del clon 7

ORIGEN

```

1 VKKLRLLLLNS ISELPQELKD QILSTRSTID KLRNRINACI KSDDREGIAH AVESMASSYC
61 ELLGHCRLLIF KKLVDENADK SLLELCIKEY QSDLNKLLEQ GIDICASEVS SECKDLVCKV
121 CEDEPEKYDS LSKVQRFREL SGEIADLDDK LTRASFVET FGLFSSRLRH YREILGDGDL
181 KFRERIVEKY QEDLKELEL SVDLHLLINL PALEDLRDHR NLVHRACNAE IEKYLTLFDD
241 QQLRFLSQEV NNAHGELIQM PSKFSIFVDG VTGIEQSTSQ VEHRSDIAK RDTTTPKQRV
301 VQGGKDDIQSS DSDSDSDSKY GDDSKKASV SAPAVDQVVP VADVQPEPQL GEGLETLESS
361 IAEGPELPGD ASTAKQSI PF AITPSSPETV DEKLESSGVS QGITTPGQR VVQGGKDDIQS
421 SDDSDSDSKYG DDDSKKASAS APAVDQVVPV ADVQPEPQLG EKLETLESSI TKGPELPGDA
481 STAKQSI PFA ITPSSPETVD EKLESSGVSQ DGITTPGQRV VQGGKDDIQSS DSDSDSKYGD
541 DDSKASASA PAVDQVPSD TRADGVSEPL ASHVQGSVDV PGDASVDGVD LRLGRLSTEQ
601 SGLLRHEQN VRAFILEQSL LDQLYMDYID LHPDQKSCEA YNSALHGYNR RLELQKEYNR
661 IFESHESASP NEINSFSQKY RAALRDVAQD IVNQGPMFYS SRDAMLLRAR VDTLDCMCRS
721 IRNLYMVELD AIDKEEKSQ SDMKSSSSD KKLIQEKIKL L

```

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

ORIGEN

```

1 ATGTTACACG TTCAAATCA TGTTGATCAA CATACAAATC ATATAGAACA TGATGATTAC
61 CATTTTACTG GTCCTACTAG TTTTGAAGTT AATCTTTCTG AAGAAGAAAA AATGGAGTTA
121 CAAGAAGTAT CTCTATTGA TAGTGTAGGA TGCGAAGATT GTGATCCAAA TTGTCGTTAT
181 CCTTTAGAAT TAGTAGAATG TCAGCGTATT GAGGAAAGAC CAGTATGCAA TGCAGGTTTA
241 GAGAGCTTGA CTGTTGATGC ATATCAATTA GGATTGTTGT TAGGTGGTTT TTTAAGTGTCT
301 ATGAATTACA TATCTTATAG CTATCCTTGT TATTATTATG ATTGTTTGTGA TAGAAATTAT
361 TACGACTGTT GTCATAAGAA TCGGTGTTAT TACAACCTGTT GTGATTGTGC GTAA

```

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

ORIGEN

```

10 1 MLHVQNHVVDQ HTNHIEHDDY HFTGPTSFEV NLSEEEKMEL QEVSSIDSVG CEDCDPNCRY
61 PLELVQCQRI EERPVCNAGL ESLTVDAYQL GLLGGFLSA MNYISYSYPC YYYDCCDRNY
121 YDCCCHKNACY YNCCDCA.

```

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

ORIGEN

1 ATGACGATTT TCTTAGAAA 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 TAGATTTACG AATACATACT
 361 TTAAGGATT TATCTGATAA AAGATTACGT GAAATTGAAA AGGGATTTAA TGATACGGTA
 421 ACAAATTTA AAAATAATTT TGGGTTAGAA CCAAATGATG GAGAACTAT TTTTGATTTA
 481 TACCTTTTGG ATGATAAGGA ACAATATAAT TATTATGGAA AGCTTTATAA CTTAGGAATT
 541 AGTGGATCTG GAGGTATGAC TTTCTATGGA AATGCTAATG TTCCATATAA AATTATATGTA
 601 CATCAATATG GTGAAATATT GAATTTAAAA CATGAATTA CTCATGCATT AGAAGTTAT
 661 GCATCTGGAC ATAAATTGCA TGGTTCGAC GTAAATAGCA GAATATTTAC GGAAGGATTA
 721 GCTGATTATA TCCAAGAAGA TAATAGTTTT ATTATGAGAG GATTAAGGA TCGAGAGATC
 781 AACTCAGATG TATTGAAAGA TTCTTCTGGT AATGTAGATC ATTTAAGTGG TGTTGCAGTG
 841 AATGAAAATC AGAGGTTAAG TTATAGTATA GGACATGCAT TTGTAAGCTT TTTACAAGAG
 901 AAATATCCTA AGTTAATTTT GGAATATTTA AACGCATTAA AAGAGGATAA TATTATTCGT
 961 GCTAAGAAA TAATTAGTAT GGATAAGTAT CCAGATTTTG AGCCGTGGGT GAAGTCTAAA
 1021 GACATTAGTT TATATTTAGA AAATATGAAT GTATTAAGT TAGGATTAGG TGAGAAAATG
 1081 TTTTCTGCTG AAAGTCTAG CTATTTTGAA GATCAAGGTG TCAATAAAGA ATATFACCAT
 1141 GAAAATATTT ATGATATGAG TGGTAAACTA GTAGGTGAAA TGTCACCTGT AGTGCATTAT
 1201 CCACAAAAAA ATGTGATTCG TATTTGGAAT ATTGCAAGTC CTGATATGAT AGAGGTGCGA
 1261 CCAGAATATA ACTTTCTGAA ATTGGTAACT ACTCCACTGC GTAAGTCTGC ATATGTATAT
 1321 TGTGATAAGA ATGGGCATGA GTATTTTAACT ACTAAAGATT ACATAGATTC TGCGTTTAAAT
 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 GAGTGTATA GGAGTAAATG GTGCAGATAT TGACAGTATT
 1741 ATTTCTAATC CAGATGTAAT GTTGCCTACT GCTGTGTTAG GTAAAAGGAAA TGCAAGTGGG
 1801 ATATCTCTAT ATGTAGATGA TCAGAAAGTT GGTGAGCTGT CAACTGAAGC AGGTTATTGT
 1861 GTTAAAAATC TTGATACTGG TAAAGTGTAT TTTATGTGCC ATAATGTTGT TGGAAATGATA
 1921 CCAAGTGGTT ATGAAGACAG AGCATATATG GTTGTATTAG AAAAAGATGG TAAGTTTACT
 1981 ACTGCTCTAG TTAATAATAT ACAAAGGCA GCAGATGGAA ATGTTGTATG GGATAATCAA
 2041 TTTAATCATC CGAATATTA TAACCTGCAC TCAAATTATA AGGAGCTGTT GTTAAATGAT
 2101 GCTTCAGTTA AAGATTACTC TCATCTGCG GATGTGAAAT TTAATAAAGA TGATACAGTA
 2161 ATTGTTAAG GTGAATTATT AGATGATAAA GGTACTGTAA GTGTAGATGA TGATGTACAT
 2221 CGTGCAGTTG TTAAGCATGA TGATCAAAATA CTACATCAGT TTAAGAGTAT GTCTTTTTAC
 2281 ATTACTGAAC CATCAGCTGA TTCAGTGAC AATTATGGAA GTGATTTTTT CATTCTGAT
 2341 GAAGGAAAAA ATCTTAGATT TCAACTTCCT AAAGCTATTA CGCATTTGAA ATTTGGTTAAT
 2401 GTTAAATGGAA ATAATAAGTT GGTACCATGT ACTAAAGATG GGAATGAACA TCCTGAAGGT
 2461 ATGCCATCTG ATTTAACGGA TGAATATAGA TATATAGATC CTATTTTTGC TCATACATTT
 2521 GAGAAACAAA GTTATTCTAA AAATAGTATT AGTGTGGGT TAGTGGACTT CAGTAAATAT
 2581 AAAGAAGGAT CTATGTTTAA ATTACAGCAT TATTCTGATG ATTATCATAT TCATAAGGAT
 2641 AACAAGGTA ATGTTATTAG GCCTAATAAC AGACTTTACG TTACAAAAGT GGATTTAGTA
 2701 TATGATGATA AAGTTATTGG GATGTTGCT GATAGTATAA ATCAATTTCA GGGTGATATT
 2761 TTCATTTCTG CAAGCCTTAA TTATAGCCAC AATGATTTTC TTTCTCTAA GTACTTTACG
 2821 AAAGTTAATA TTGAGGCGTT AGAAAATGGA ATATATAGTG GAAGATATGA TGTAGGAGAT
 2881 GGTGACAAA TAGCACCCT TAATACTGAT ACAGTTTATA GTGATAAAGC TATTTTTTAC
 2941 TTTAAAAATG ATAGCGCATC TACTGATATG CCGGCTAGTG ATGTTACTAC TATTTTACCT
 3001 TATATAATG ACCTTTAA

SEQ ID NO: 12 Secuencia de la proteína ribosomal L1

ORIGEN

1 MTIFLESDD KSNFKKTLN GTKDKTNLDN TYYDYHHEDD MGNTYHYVVS LDRVHVKMP
 61 EEPVGYGGDT LPIVPTTAAS VGS DAGVAV GNVKDFEDNV FHHTSTIRND ELKIDLRHT
 121 LKDLSDKRLR EIEKGFHDTV TKFKNFNGLE PNDGETIFDL YLFDDKEQYN YGKLYNLGI
 181 SSGSGMTFYG NAWVPYKIYV HQYGEILLNK HELTHALESY ASGHKLHGSD VNSRIFTEGL
 241 ADYIQEDNSF IMRGLKDREI TSDVLKDSGG NVDHLSGVAV NENQRLSYSI GHAFVSLQE
 301 KYPKLISEYL NALKEDNIIR AKEIISMDKY PDEFPWKSK DISLYLENMN VLKGLGKEM
 361 FSAESASYFE DQGVNKEYYH ENIYDMSGKL VGEMSPVVHY AQKNVIRIWN IASPDMEIVR
 421 PEYNFLKLV TSGKSAVYV CDKNGHEYFN TKDYIDSAFN ILARYDVKLR ESSDALDIRG
 481 RYSDAAKVFS KLPNADLLD KFLEKIGYSS YKQIIMSNE QLNSIKAYVV KEVFENFRES
 541 EVKKLVSGES HPEVRNVLMD LTYVDLKSVI GVNADIDS I SNPDMMLRT AVLGRGNASG
 601 ISLYVDDQKV GELSTEAGYC VKNLDTGKVV FMPHNVVGMI ASGYEDRAYM VVLEKDGKFT
 661 TALVNIHQKA ADGNVVDHQ FHHPNINLH SHYKELLLND ASVKDYSHLA DVKFNKDDTV
 721 IVKGELLDK GTVSVDDVH RAVVKHDDQI LHQFKSMSFY ITEPSADSGD NYGSDFFISD
 781 EGKHLRFQLP KALTHLKLMD VGHINLKVPC TKDGNHEPEG MPSDLTDEYR YIDPIFAHTF
 841 EKQSYSKNSI SVGLVDFSKY KEGSMFKLQH YSDDYHIHKD EQGNVIRPNN RSYVTKVDLV
 901 YDDKVIQMLS DSIHQFQDI FISASLNYSH NDFLSSKYFQ KVNIEALENG IYSGRYDVG
 961 GDQIAGLNTD TGYSDKAIFY FKNSASTDM PASDVTTILF YINEL.

5

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

ORIGEN

1 ATGGATAGTA TAAGTGCAAA TCACATACGC AATATTTTAT TCCTTGTTTT AGGCGCATT
 61 TTTGGACTGG AATTTTGCTT TTATTATCA GGTGTATTAT TCATCTTAAT GGTCTGGGGA
 121 CCAAATTACC TAGATTTTAA TGCTATAAAT CCCAGTTTGA GTGATTTTCC AGACAGAATT
 181 TGGCCAAC TA TTTTGGACTA TGTACAACAT TGGTGGGAAGA ACCCTTCTGC ATACGATGCA
 241 GTTTTATTAC TTAAGCTAAT AACGTCATTA TGTACACCAG TAGGTATTCT AAGCATAGTA
 301 TTATGGAACC TTAGAAATAT ATTATTCGAT TGGAGGCCAT TTAAGAAGAA AGAATCACTG
 361 CATGGAGATT CAAGATGGGC AACAGAAAAA GATATTCGCA AAATAGGATT ACGTAGTAGA
 421 AAAGGAATAT TATTAGGGAA AGACAAGAGA GGATATCTCA TTGCAGATGG ATATCAACAT
 481 GCATTGTTAT TTGCACCAAC TGGATCCGGA AAAGGTGTAG GTTTTGTAAAT ACCAAACTTA
 541 TTATCTGGG AAGATTCTGT AGTAGTACAC GATATAAAAT TAGAGAACTA TGATCTTACA
 601 AGTGGGTGGA GAAAAAAG GGGACAAGAA GTTTTCGTGT GGAACCCAGC ACAACCTGAC
 661 GGTATAAGTC ACTGTTACAA CCCATTAGAT TGGATAAGCT CTAAGCCTGG ACAATGGTA
 721 GATGATGTAC AAAAATTGC CAATCTAATA ATGCTGAAC AAGATTTTGT GTATAACGAA
 781 GCACGTAGTT TATTTGTAGG AGTAGTATTA TACTTACTAG CAGTACCAGA AAAAGTAAAA
 841 TCCTTTGGAG AAGTTGTAA GACAATGCGC AGCGATGACG TAGTCTACAA CTTAGCAGTA
 901 GTACTAGACA CAATAGGGAA AAAGATTCAC CCAGTTGCAT ACATGAATAT AGCTGCATT
 961 TTACAAAAG CAGACAAAGA ACGCTCAGGT GTTGTATCAA CTATGAACTC ATCTTTAGAA
 1021 TTATGGGCAA ACCCATTAAT AGATACAGCA ACAGCATCAA GTGATTTTAA TATCAAGAA
 1081 TTTAAAAGGA AAAAAGTAAC AGTATATGTT GGATTAACAC CAGATAATTT AACTCGTCTT
 1141 AGACCTTTAA TGCAGGTATT TTATCAACAA GCTACAGAAT TTTTATGTAG AACTTTACCA
 1201 TCAGATGATG AACCATATGG TGTACTGTTC TTAATGGATG AGTTTCCAAC ATTAGGAAAA
 1261 ATGGAGCAAT TTCAAACAGG TATCGCATAT TTCCGTGGAT ATAGAGTTAG ACTATTTTTG
 1321 ATTATTCRAG ATACTGAACA GCTTAAGGGT ATATATGAAG AAGCAGGAAT GAATCATT
 1381 TTATCAAAT CTACTTATAG AATAACTTTT GCTGCAAATA ATATAGAAAC TGCAAAATTA
 1441 ATATCACACT TAATAGGAAA TAAAACCTGTT AACCAAGAGT CTTTAAACAG ACCTAAATTT
 1501 TTAGATTTGA ACCCTGCATC ACGTTCATTA CATATATCAG AAACACAAG AGCTTACTA
 1561 TTACTCAAG AAGTAATAAT GTTACCAGA GATGAGCAAA TACTTTTAAAT AGAATCTACT
 1621 TATCCTATAA AATCAAAGAA AATAAATAC TATGAAGACA AAAATTTTAC AAAAAACTA
 1681 TTAAGAGTA CCTTTGTTC AACTCAAGAG CCTTATGATC CCAACAAAAC AAAAAACGCA
 1741 ACAAAAGAAA ACGAAGAACC TATGCCAAGT ATTGAAAGCG ATCTTCTTAA AAATACATCT
 1801 GACAATACTG AAAACAATAT GGAAGATGGT GCAATGTACA GCAGCATAGA AGAAGATTAT
 1861 GACGATGATG ATGATGATTT TAATTTGAA GACTTAGATG AATATATGGA TGAAGAAGAA
 1921 GATTATGATG ATGAAGAATA TGATGATATA GATTATGATG ATAATAACAA TAGTAATGAG
 1981 GAGTATGAAG AAGATAATCC AGAAGAAGAT GACAATAGCA ATAATCTAGA CGATGAGGAA
 2041 GAGGAAGAAG ATAATATTAT AGATTATGAA GATGAAGAAG AATATGATGA TAACATAGAC
 2101 TACAAAGATG ATGACAATAA CTACAACAAA GATACCACTG ACGATCAAGA CTCAAAAAAA
 2161 CATAATGAAT AG

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

ORIGEN

1 MDSISANHIR NILFLVLGAF FGLEFCFYLS GVLFILMVWG PNYLDFNAIN PLSLDFPDRI
 5 61 WPTIFDYVQH WKNPSAYDA VLLLKLITSL CTPVGILSIV LWHLRHILFD WRPFKKKESL
 121 HGDSRWATEK DIRKIGLRSR KGILLGKDKR GYLIADGYQH ALLFAPTGS GKVGFVPIPHL
 181 LFWEDSVVVH DIKLENYDLT SGWRKRGQE VFVWNPAQPD GISHCYNPLD WISSKPGQMV
 241 DDVQKIANLI MPEQDFWYNE ARSLFVGVVL YLLAVPEKVK SFGEVVRTMR SDDVVYNLAV
 301 VLDITIGKKIH PVAYMNIAAF LQKADKERSG VVSTMNSLE LWANPLIDTA TASSDFNIQE
 361 FKRKKVTVYV GLTPDNLTRL RPLMQVFYQQ ATEFLCRTLP SDDEPYGVLF LMDEFPTLKG
 421 MEQFQTGIAY FRGYRVRFLF IIQDTEQLKG IYEEAGMHSF LSNSTYRITF AANNIETAIL
 481 ISQLIGNKTV NQESLNRPKF LDLNPASRSL HISETQRALL LPQEVIMLPR DEQILLIEST
 541 YPIKSKKIKY YEDKNFTKKL LKSTFVPTQE PYDPNKTKTA TKENEEMPMS IESDLFKNTS
 601 DNTENMEDG AMYSSIEEDY DDDDDFNFE DLDEYMDEEE DYDDEEYDDI DYDDNHSNE
 661 EYEEDNPEED DNGMHLDEE EEDENIIDYE DEEBYDDHID YKDDHNYNK DTTDDQDSKK
 721 HNE.

SEQ ID NO: 15

MDIDNNVTTSSTQDKSGNLMEVIMRILNFGNNSD
 EKVSNE^DTKVLVESLQPAVNDNVGNPSSSEVGKEEN
 APEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVGK^KVSETSK^EE
 STPEVKAEDLQPAVDG^SIEHSSSEVG^EKVSK^TSKE
 ESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSETSK
 EENTPEVKAEDLQPAVDG^SIEHSSSEVG^EKVSK^TS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSET
 SKEENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSK
 TSKEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSK
 ETSKEENTPEVRAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKV
 SETSKEESTPEVKAEDLQPAVD^SIEHSSSEVG^KK
 VSETSK^EESTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^E
 KVSETSK^EENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG
 EKVSETSK^EENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEV
 GEKVSETSK^EESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSE
 VGEKVSETSK^EESTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSS
 EVGEKVSETSK^EESTPEVKA^EVQPVADGNPVLNP
 MPSIDNIDTNIIFHYHKDCCKGSAVGTDEMCCPVS
 ELMAGEHVHMYGIYVYRVQSVKDLSGVFNI^DHSTC
 DCNL^DVYFVGYNSFTNKETV^DLI

SEQ ID NO: 16

KEENAPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^KKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDG^SIEHSSSEVG^EKVSK^TS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDG^SIEHSSSEVG^EKVSK^TS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSK^TS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEENTPEVRAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVD^SIEHSSSEVG^KKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDD^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^EKVSETS
 KEESTPEVKA^E

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

5 CPEVKAEDLQPAVDG^SVEH

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

CEVGKEENAPEVKAEDLQPAVDG^SVEH

SEQ ID NO: 20 *E. canis*

CKEESTPEVKAEDLQPAVDG^SVEHSSSEVG^KKVSETS

10 SEQ ID NO: 21

XPEVKAEDLQPAVDG^SVEHX, en donde X = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos.

SEQ ID NO: 22

CMLHVQNHVDQHTNHIEHDDYHFTGPT

SEQ ID NO: 23

15 CTNHIEHDDYHFTGPTSFEVNLSEEEKMEL

SEQ ID NO: 24

CTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVSSIDS

SEQ ID NO: 25

XMLXVQNHVDQHTNHIEHDDYHFTXPT

20 En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, la X en la posición 4 es H o Q y la X en la posición 25 es D o G.

SEQ ID NO: 26

XTNHIEHDDYHFTXPTSFEVNLSEEEKMEL

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente y la X en la posición 14 es G o D.

SEQ ID NO: 27

5 XTXPTSFEVNLSEEEKMELQEVSSIDS

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, y la X en la posición 3 es G o D.

SEQ ID NO: 28

XTNHIEHDDYHFTXPT

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, y la X en la posición 14 es G o D.

10 SEQ ID NO: 29

XTXPTSFEVNLSEEEKMEL

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, y la X en la posición 3 es G o D.

SEQ ID NO: 30

XTNHIEHDDYHFTXPTSFEVNLSEXEKMEL

15 En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, la X en la posición 14 es G o D, y la X en la posición 25 es E o G.

SEQ ID NO: 31

XTXPTSFEVNLSEXEKMELQEVSSIDS

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, la X en la posición 3 es G o D, la X en la posición 14 es E o G.

SEQ ID NO: 32

20 XTXPTSFEVNLSEXEKMEL

En donde la X en la posición 1 es C o está ausente, la X en la posición 3 es G o D, y la X en la posición 14 es G o E.

SEQ ID NO: 33

XMLXVQNHVDQHTNHIEHDDYHFTXPTSFEVNLSEXEKMELQEVSSIDS

25 En donde la X en la posición 1 está ausente o es c, la X en la posición 4 es H o Q, la X en la posición 25 es D o G, y la X en la posición 36 es E o G.

Otras realizaciones de la invención proporcionan los siguientes polipéptidos:

- (a) SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 1 está ausente o es C, la X en la posición 4 es H o Q, la X en la posición 25 es D o G, y la X en la posición 36 es E o G;
- 30 (b) Los aminoácidos 1-27 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 1 es C, la X en la posición 4 es H, la X en la posición 25 es D o G;
- (c) Los aminoácidos 13-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G; y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (d) Los aminoácidos 24-49 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- 35 (e) Los aminoácidos 1-27 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 1 es C o está ausente, y en donde la X en la posición 25 es D o G;
- (f) Los aminoácidos 13-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- 40 (g) Los aminoácidos 24-49 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;

ES 2 720 363 T3

- (h) Los aminoácidos 13-27 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (i) Los aminoácidos 24-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- 5 (j) Los aminoácidos 13-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- (k) Los aminoácidos 24-49 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal;
- 10 (l) Los aminoácidos 24-41 de SEQ ID NO: 33, en donde la X en la posición 25 es D o G, la X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino terminal.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo que son específicos para *E. canis*, en una muestra de prueba canina o humana, en donde la muestra de prueba se selecciona del grupo que consiste en plasma, sangre, suero, saliva, orina, heces, exudado de heridas, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen, esputo, extractos de tejidos y extractos celulares, que comprende:
- 5 (a) poner en contacto la muestra de prueba con uno o más polipéptidos purificados que consisten en SEQ ID NO: 33, en donde los uno o más polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*, en condiciones adecuadas para la unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y
- 10 (b) detectar la presencia de unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos;
- en donde la presencia de unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno indica la presencia de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos específicos para *E. canis* en la muestra de prueba, en donde los uno o más polipéptidos purificados están unidos preferiblemente a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoacídico, un conector aminoacídico, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente detectar la cantidad de unión específica.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más polipéptidos purificados se inmovilizan en un soporte sólido.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de unión específica de los uno o más polipéptidos purificados a anticuerpos específicos para *E. canis* en la muestra de prueba indica que el cánido o el ser humano han sido infectados por *E. canis*.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente determinar si los anticuerpos de la muestra de prueba se unen específicamente a uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados que son antígenos de la vacuna contra *E. canis*, en donde si los anticuerpos de la muestra de prueba se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el cánido o el ser humano han sido infectados por *E. canis* y el estado de vacunación contra *E. canis* es desconocido;
- 30 en donde si los anticuerpos de la muestra de prueba no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, en ese caso el cánido o el ser humano no han sido infectados por *E. canis* y han sido vacunados contra *E. canis*;
- y en donde si los anticuerpos de la muestra de prueba no se unen específicamente a los uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente a los uno o más segundos polipéptidos purificados, en ese caso el cánido o el ser humano no han sido vacunados contra *E. canis* y no han sido infectados por *E. canis*.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde en SEQ ID NO: 33, la X en la posición 1 está ausente o es C, la X en la posición 4 es H o Q, la X en la posición 25 es D o G, y la X en la posición 36 es E o G.
7. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
- 40 8. Una composición que comprende uno o más polipéptidos purificados que consisten en SEQ ID NO: 33.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde los uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
10. La composición de la reivindicación 8, en donde los uno o más polipéptidos purificados están unidos a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador aminoacídico, un conector aminoacídico, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.
- 45 11. Un método de control del tratamiento de una infección por *E. canis* en un paciente canino o humano que comprende:
- 50 (a) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una primera muestra de prueba del paciente antes o en las primeras etapas de un tratamiento para una infección por *E. canis* mediante el método de la reivindicación 4, en donde la muestra de prueba se selecciona del grupo que consiste en plasma, sangre, suero, saliva, orina, heces, exudado de heridas, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen, esputo, extractos de tejidos y extractos

celulares;

(b) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una segunda muestra de prueba del paciente después de efectuar el tratamiento mediante el método de la reivindicación 4; y

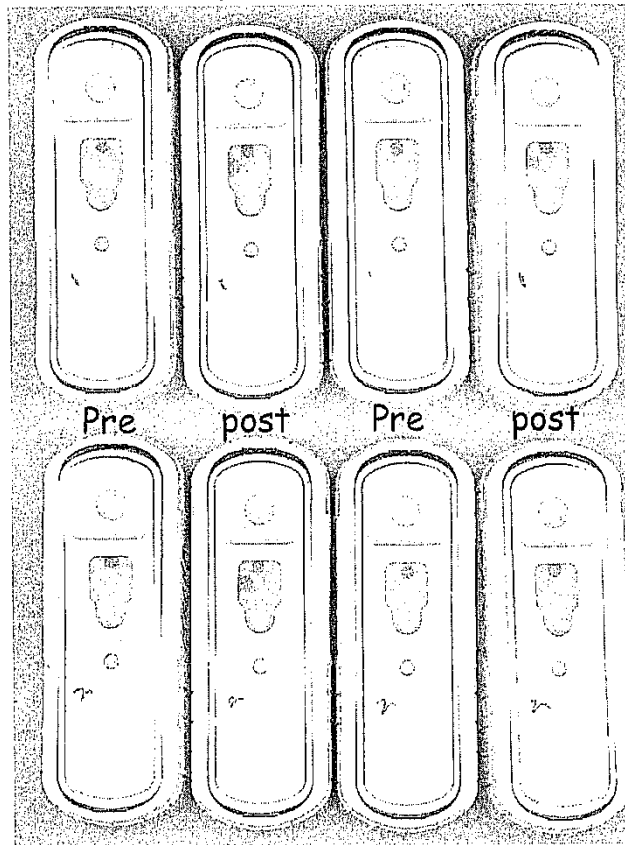
5 (c) comparar la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* en la primera muestra de prueba con la cantidad de anticuerpos de *E. canis* en la segunda muestra de prueba para evaluar un cambio y de ese modo controlar el tratamiento.

FIG. 1

HTWM / LYME / EC: SNAP 3 DX

Pre post Pre post

ÓXIDO DE ALUMINIO



RIBI

FIG. 2

ANÁLISIS EN GEL 2D DE
E. canis AISLADO - TEÑIDO CON AZUL
DE COOMASIE BIOSAFE

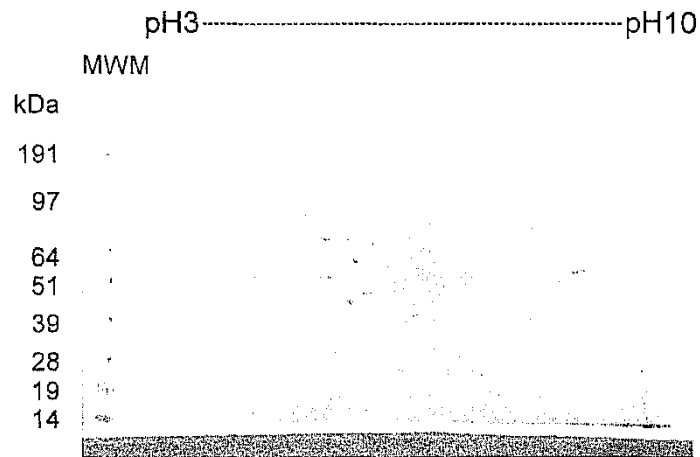


FIG. 3

TRANSFERENCIA WESTERN DE PROTEÍNAS DE *E. canis* RESUELTA
UTILIZANDO GELES 2D SONDEADOS CON PLASMA CANINO NORMAL

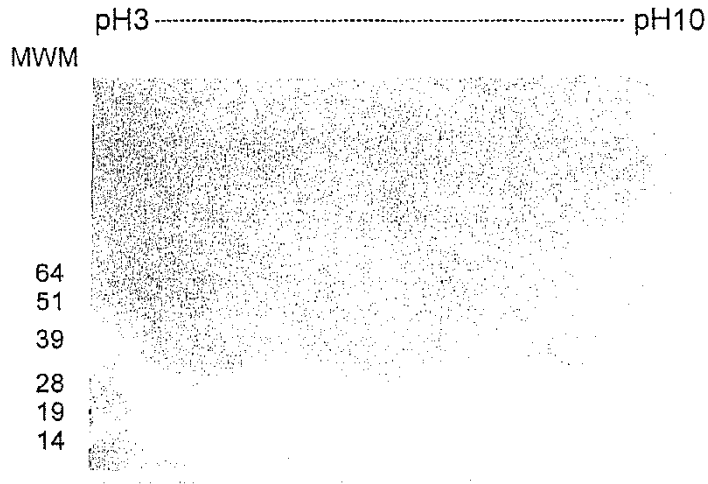


FIG. 4

ANÁLISIS WESTERN CON UN GRUPO DE SUEROS VACUNADOS DE 4
PERROS VACUNADOS - 1:100

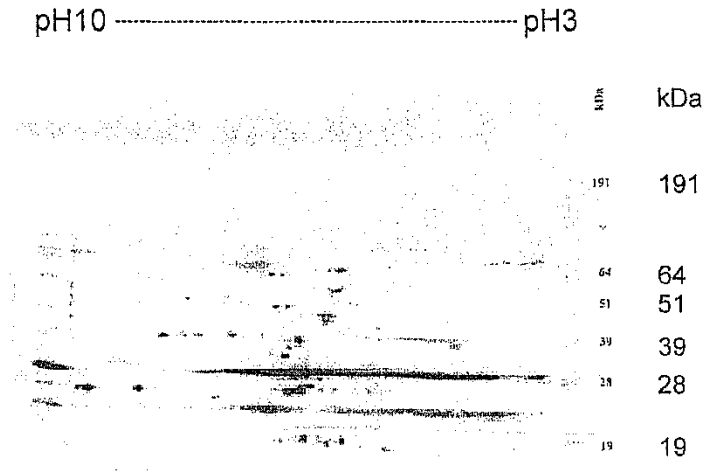


FIG. 5

ANÁLISIS WESTERN CON UN GRUPO DE SUEROS INFECTADOS DE 3
PERROS POSITIVOS - 1:100

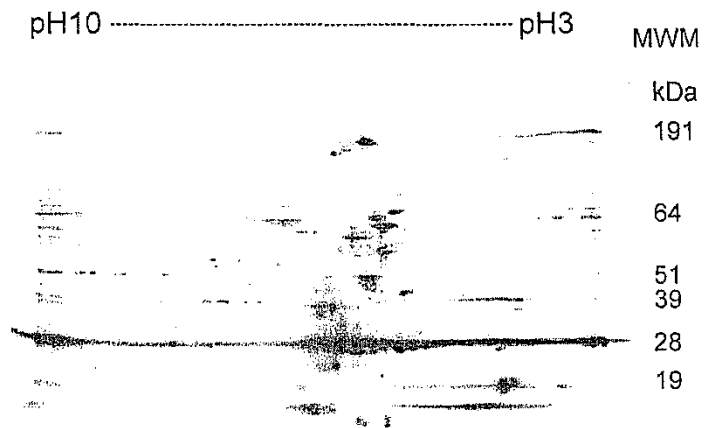


FIG. 6

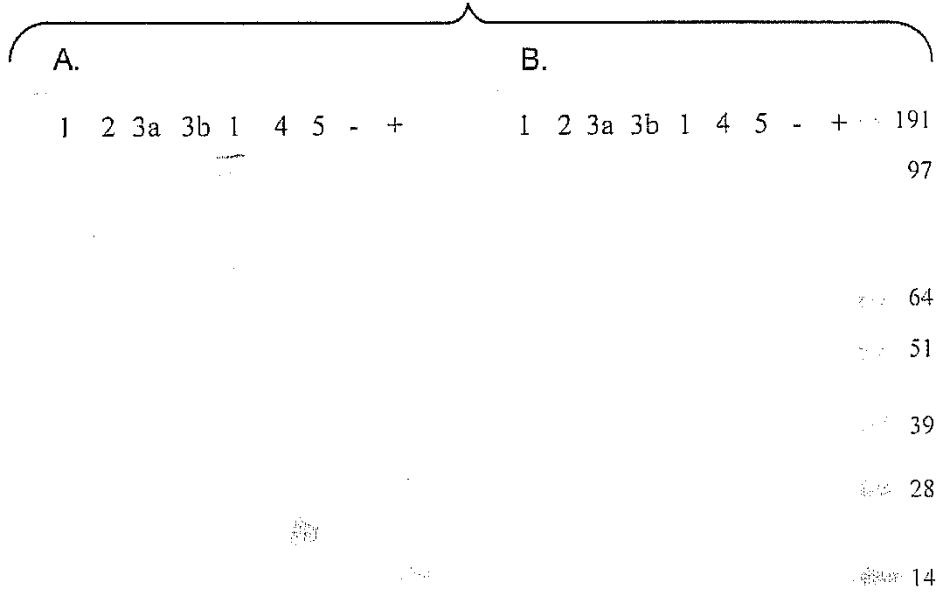
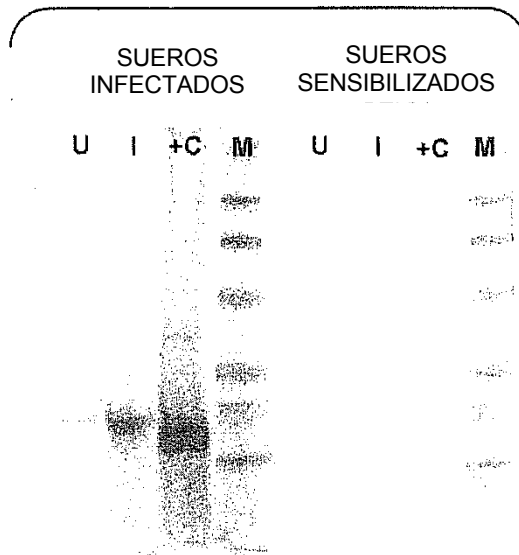


FIG. 7



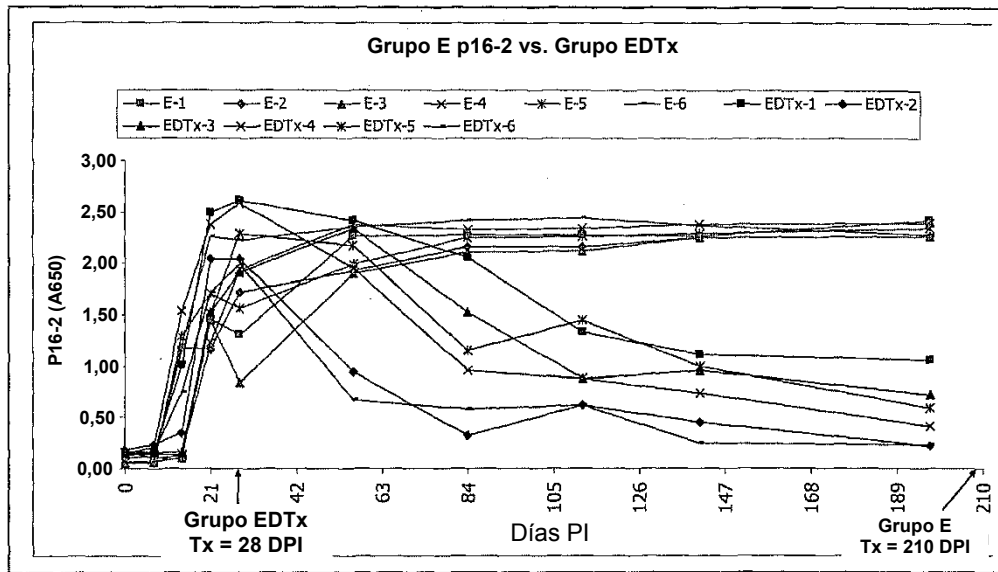


Figura 8

**Perros de control - No sometidos a tratamiento previo
(sin exposición previa a antígenos)**

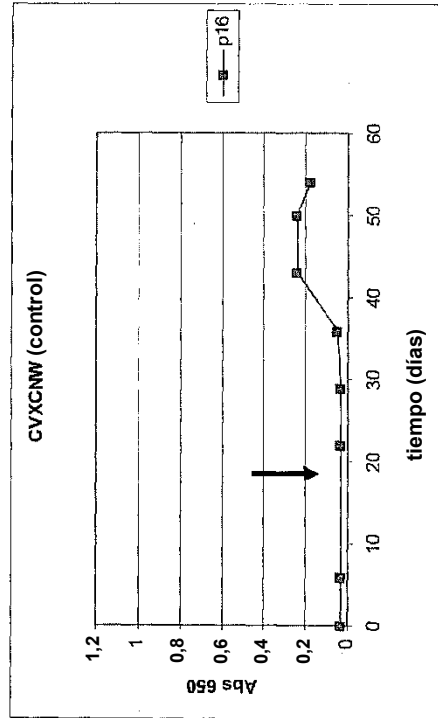


Figura 9A

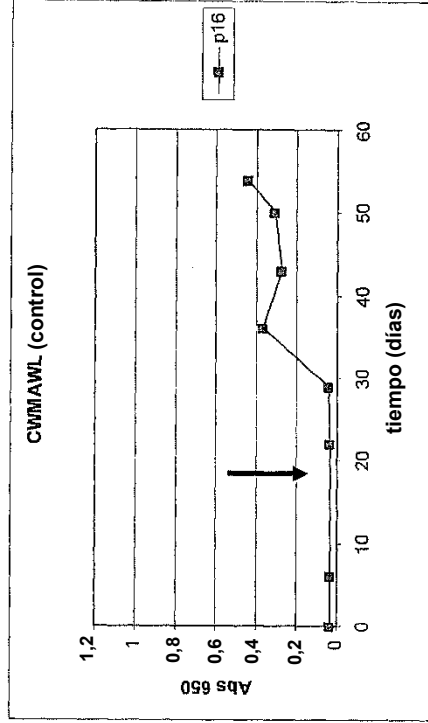


Figura 9B

Perros vacunados - Coadyuvante RIBI

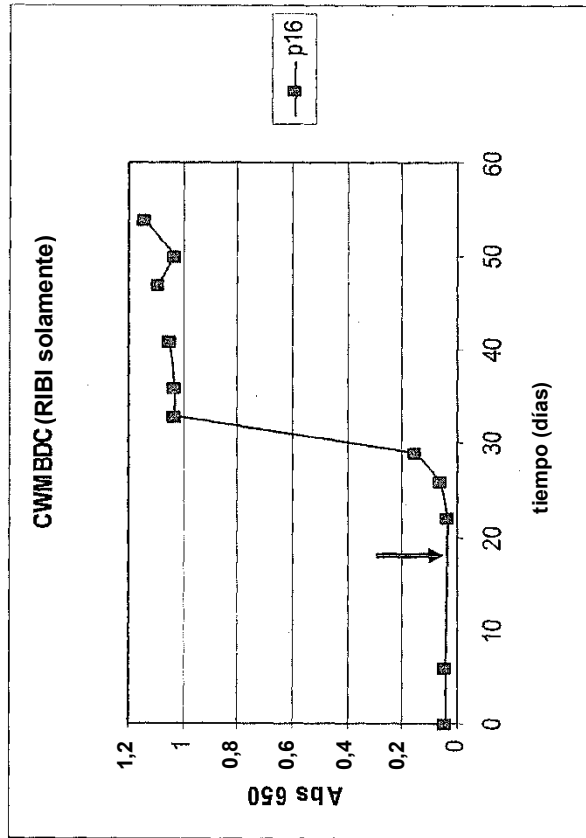


Figura 10A

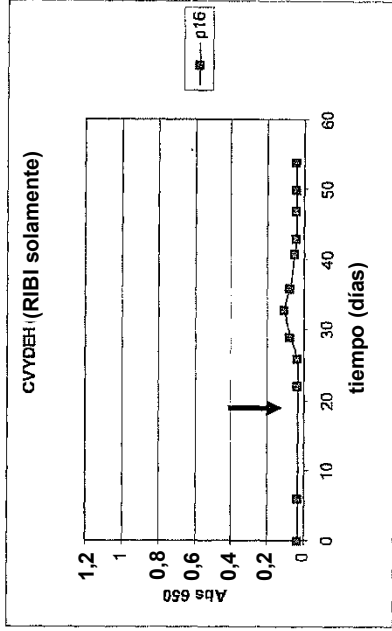


Figura 10B

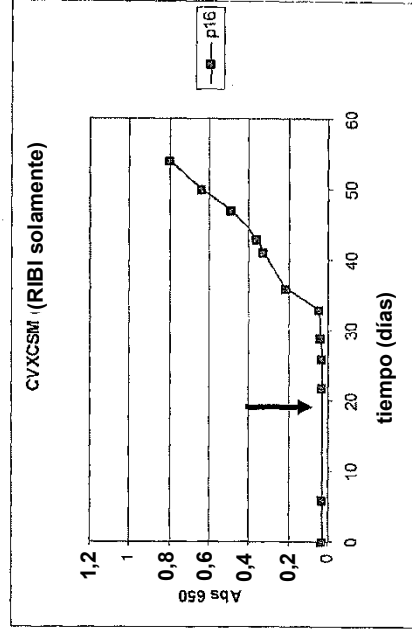


Figura 10C

Perros vacunados - Coadyuvante RIBI + BCG

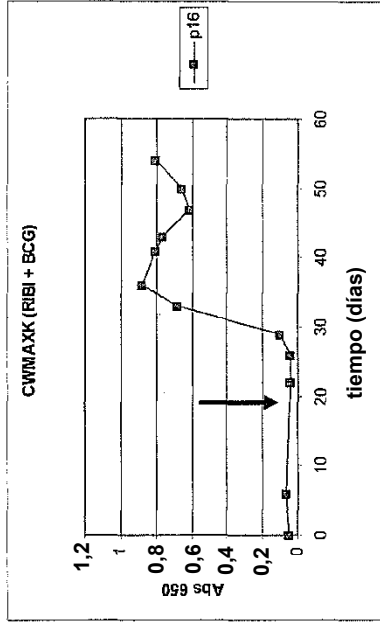


Figura 11B

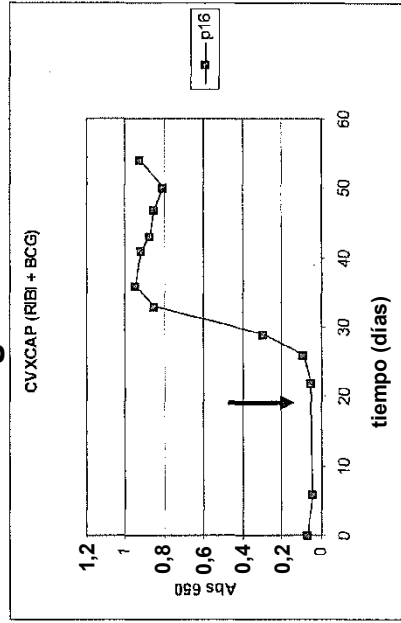


Figura 11C

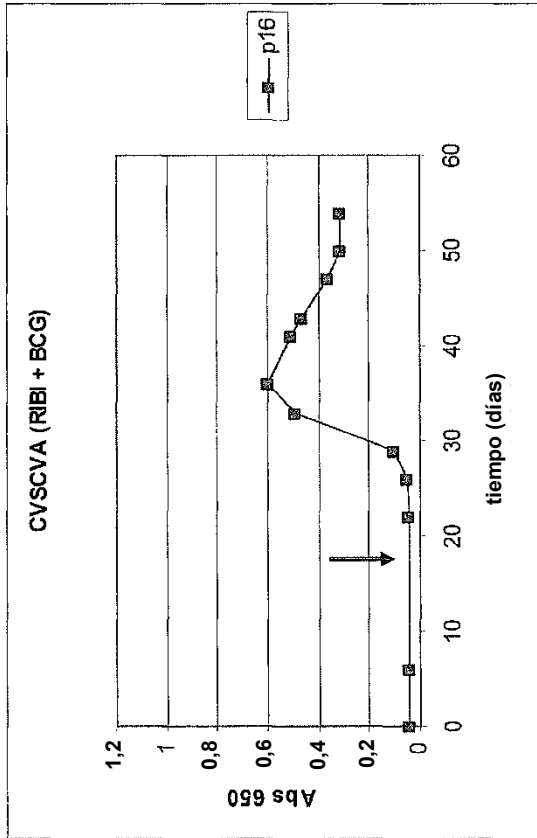


Figura 11A