(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 734 226**

(51) Int. CI.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2009 E 14175403 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2801823**

(54) Título: **Métodos, dispositivos, kits y composiciones para detectar gusanos látigo**

(30) Prioridad:

19.05.2008 US 128076 P
19.05.2008 US 128077 P
19.05.2008 US 128079 P
19.05.2008 US 128099 P
12.12.2008 US 122254 P
12.12.2008 US 122260 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2019

(73) Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (50.0%)
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092, US y
MONSANTO COMPANY (50.0%)

(72) Inventor/es:

ELSEMORE, DAVID ALLEN;
GENG, JINMING;
FLYNN, LAURIE A. y
CRAWFORD, MICHAEL B.

(74) Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos, dispositivos, kits y composiciones para detectar gusanos látigos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones, dispositivos, kits y métodos para la detección de, y la distinción entre, gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho en mamíferos. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos y composiciones de anticuerpos, dispositivos, kits y métodos para detectar la presencia o ausencia de antígeno de gusano látigo en una muestra de un mamífero y para distinguir entre antígenos de gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho.

2. Descripción de la técnica anterior

Las infecciones por gusanos parásitos (helmintos) son comunes en animales y, si no se diagnostican y se tratan, pueden provocar una enfermedad grave o la muerte. Los métodos actuales para el diagnóstico de infecciones por gusanos parásitos implican principalmente el examen microscópico de muestras fecales, o bien directamente en frotis fecales o bien tras la concentración de huevos y parásitos mediante flotación en medios de densidad. A pesar de la alta aceptación de este procedimiento, el método tiene limitaciones significativas. Estos métodos microscópicos llevan mucho tiempo y requieren equipo especializado. Además, la precisión de los resultados de estos métodos depende en gran medida de la habilidad y experiencia del operario. Por ejemplo, la presencia de gusanos látigos se determina buscando huevos, pero estos se excretan de manera intermitente y en pequeños números. Los gusanos de gancho son difíciles de detectar por el médico medio en fase temprana de la infección o en animales jóvenes. La especificidad del diagnóstico de gusanos redondos usando examen microscópico es de aproximadamente el 50%.

El documento 2004/214244 se refiere a un método para detectar una infección por gusanos parásitos pero no divulga los presentes anticuerpos específicos.

Drake *et al*, Proc of the Royal Soc B: Biol Sci vol 265, n.º 1405, 22 de agosto de 1998, págs. 1559-1565 divulgan un anticuerpo y una proteína recombinante de *Trichuris trichiura* pero no divulgan los anticuerpos específicos comentados por la presente invención.

La manipulación de heces es desagradable y peligrosa. Los procedimientos higiénicos e inofensivos para procesar heces son molestos y con frecuencia complejos. Tales procedimientos pueden incluir pesada, centrifugación y almacenamiento, y son difíciles excepto en un laboratorio clínico equipado con un aparato adecuado, equipo de protección y un técnico especializado. Por tanto, es deseable cualquier reducción en el número de etapas requeridas para realizar una prueba fecal y cualquier reducción en el contacto entre el operario de la prueba y el material de prueba. Los laboratorios clínicos han estado usando métodos de inmunoensayo para la detección de diversos virus, bacterias y parásitos no helmínticos y organismos en las heces. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de un método de inmunoensayo sencillo para la detección de una infección por gusanos parásitos en las heces, en sangre completa o en suero.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un dispositivo para unir específicamente y aislar antígenos de gusano látigo de una muestra, por ejemplo coproantígenos de una muestra fecal, comprendiendo el dispositivo un soporte sólido, tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El dispositivo puede ser, pero no se limita a ser, por ejemplo, un dispositivo de ELISA, tal como un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral o dispositivo de placa de microtitulación. Las muestras que pueden someterse a prueba para detectar gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho mediante el dispositivo incluyen, pero no se limitan a ser, heces, mucosa del tracto digestivo, orina, sangre completa, suero, leche materna y tejido completo, tal como tejido de glándula mamaria, intestino, hígado, corazón, pulmón, esófago, cerebro, músculo y ojo, por ejemplo. El dispositivo puede incluir además, pero no necesita incluir, uno o más reactivos para la detección de uno o más del grupo que consiste en: uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos y una o más bacterias.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método de detección de la presencia o ausencia de antígenos de gusano látigo en una muestra, por ejemplo coproantígenos de una muestra fecal, comprendiendo el método las etapas tal como se definen en las reivindicaciones. El uno o más coproantígenos helmínticos incluyen coproantígenos de gusano látigo tales como *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris discolor,* por ejemplo, en una muestra obtenida de un mamífero, tal como un animal canino, animal felino, animal porcino, animal bovino o ser humano y distinguir entre gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho. En un aspecto, se lleva a cabo el método para someter a prueba una muestra fecal de mamífero para detectar coproantígeno de gusano látigo. Sin embargo, el método no se limita a llevarse a cabo para someter a prueba una muestra fecal. Por tanto, además de heces, la muestra puede ser, pero no se limita a ser, sangre

completa, suero, leche materna y tejido completo, tal como tejido de glándula mamaria, intestino, hígado, corazón, pulmón, esófago, cerebro, músculo y ojo, por ejemplo.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de si un mamífero tiene infección por un gusano látigo intestinal, comprendiendo el método las etapas de la reivindicación 14. El método también puede usarse para someter a prueba, y distinguir entre, contaminación del entorno con gusano redondo, gusano látigo y/o gusano de gancho. Las muestras del entorno que pueden someterse a prueba para detectar gusano látigo mediante el dispositivo incluyen, pero no se limitan a, tierra, material en descomposición o material fecal de zonas residenciales incluyendo patios, jardines, areneros, parques infantiles. Las ubicaciones de pruebas también pueden incluir parques, playas, bosques, granjas u otras ubicaciones expuestas a material fecal de perros, gatos u otros huéspedes mamíferos de gusanos redondos. También pueden someterse a prueba heces de cajas de arena de interior y exterior.

En aún otro aspecto, la presente invención incluye un kit para llevar a cabo una o más etapas del método de la invención. El kit puede incluir opcionalmente, por ejemplo, el dispositivo y una o más de las composiciones de la presente invención e instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. El kit puede incluir opcionalmente además, por ejemplo, uno o más reactivos indicadores, uno o más compuestos de marcaje de anticuerpos, uno o más anticuerpos, uno o más reactivos de captura de antígeno, uno o más inhibidores y uno o más reactivos de lavado que van a usarse como parte del dispositivo y/o que van a usarse para llevar a cabo el método.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de un ensayo ELISA, que se llevó a cabo usando un dispositivo de flujo lateral y que sometió a prueba muestras fecales de animales caninos con infección por gusano redondo, gusano látigo y/o gusano de gancho siguiendo el método de la presente invención en un primer ejemplo.

La figura 2 muestra los resultados de un ensayo ELISA, que se llevó a cabo usando una placa de microtitulación y que sometió a prueba muestras fecales de animales caninos con infección por o bien gusano redondo, gusano de gancho, gusano látigo o bien gusano del corazón siguiendo el método de la presente invención en un segundo ejemplo.

La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 1210 nucleótidos de *Trichuris vulpis* adulto completo (SEQ ID NO: 1).

La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 1059 nucleótidos de *Trichuris vulpis* adulto completo (SEQ ID NO*:* 2).

La figura 5 muestra una alineación de comparación de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. La secuencia consenso de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 se muestra como SEQ ID NO: 9.

La figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 865 nucleótidos de *Toxocara canis* adulto completo (SEQ ID NO: 10).

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 632 nucleótidos de *Toxocara cati* adulto completo (SEQ ID NO: 11).

La figura 8 muestra una alineación de comparación de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. La secuencia consenso de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 se muestra como SEQ ID NO: 16.

La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 535 nucleótidos de *Toxocara canis* adulto completo (SEQ ID NO*:* 17).

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 536 nucleótidos de *Toxocara cati* adulto completo (SEQ ID NO*:* 18).

La figura 11 muestra una alineación de comparación de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21. La secuencia consenso de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 se muestra como SEQ ID NO: 23.

La figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 469 nucleótidos de *Toxocara canis* adulto completo (SEQ ID NO*:* 24).

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de 548 nucleótidos de *Toxocara cati* adulto completo (SEQ ID NO*:* 25).

La figura 14 muestra una alineación de comparación de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. La secuencia consenso

de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 se muestra como SEQ ID NO: 30.

La figura 15 muestra un ELISA con fracciones de elución de columnas SP como muestras y que Copro6728 puede purificarse parcialmente y enriquecerse mediante elución de la columna SP siguiendo el método de la presente invención en el tercer ejemplo.

La figura 16 muestra que el peso molecular de Copro6728 era de aproximadamente 7 kD usando una inmunotransferencia de tipo Western con sonda de IgG de conejo anti-DIV6728 de longitud completa-HRP siguiendo el método de la presente invención en el tercer ejemplo.

La figura 17 muestra que el peso molecular de Copro6728 era de aproximadamente 7 kD usando un gel de SDS-PAGE teñido con tinción de proteína Imperial siguiendo el método de la presente invención en el tercer ejemplo.

La figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de DIV6728 de longitud completa (SEQ ID NO: 21) con los dos péptidos (SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36) identificados mediante análisis de espectrometría de masas identificados resaltándolos en los recuadros sombreados siguiendo el método de la presente invención en el tercer ejemplo.

La figura 19 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de 6728N (SEQ ID NO: 37) y 6728C (SEQ ID NO: 38) codificadas por los constructos siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 20 muestra un gel de SDS-PAGE cargado con diferentes muestras para comprobar la purificación de 6728N recombinante siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 21 muestra un gel de SDS-PAGE cargado con diferentes muestras para comprobar la purificación de 6728C recombinante siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 22 muestra los datos de ELISA obtenidos con diferentes muestras fecales para someter a prueba los diferentes anticuerpos policlonales contra diferentes proteínas 6728 recombinantes siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 23 muestra los datos de ELISA obtenidos con proteínas recombinantes para someter a prueba los diferentes anticuerpos policlonales contra diferentes proteínas 6728 recombinantes siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 24 muestra inmunotransferencia de tipo Western con diferentes muestras fecales con sondas de IgG de conejo anti-DIV6728 de longitud completa-HRP siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 25 muestra inmunotransferencia de tipo Western con diferentes muestras fecales con sondas de IgG de conejo anti-6728C-HRP siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

La figura 26 muestra inmunotransferencia de tipo Western con diferentes muestras fecales con sondas de IgG de conejo anti-6728N-HRP siguiendo el método de la presente invención en el cuarto ejemplo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

I. Introducción

La presente invención se refiere de manera general a métodos, dispositivos y kits para detectar y distinguir entre gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho en una muestra fecal obtenida de un mamífero. La presente invención se refiere a gusano látigo, tal como *Trichuris vulpis*, *Trichuris serrata*, *T. campanula* y *Trichuris trichiura*.

La presente invención proporciona una alternativa superior a las técnicas de inspección microscópica existentes. Esto es cierto porque la presente invención proporciona dispositivos, kits y métodos para detectar la presencia o ausencia de gusano látigo en una muestra de un mamífero que: (1) son tanto fáciles de usar como proporcionan sistemáticamente resultados fiables; (2) permiten confirmar la ausencia o presencia de gusano látigo en un mamífero independientemente de si ese mamífero tiene infección por gusano de gancho, gusano redondo y/o gusano del corazón; (3) pueden detectar gusano látigo antes del momento en el que aparecen por primera vez los huevos en las heces del huésped infectado; y (4) pueden distinguir entre infecciones por gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de propiedades inesperadas de composiciones específicas para infecciones por gusano látigo. Específicamente, se determinó que pueden usarse anticuerpos obtenidos contra polipéptidos específicos de gusano (u obtenidos contra un extracto de gusanos completos, o extracto de órganos reproductores de gusanos, o extracto de intestinos de gusanos) para capturar, detectar y distinguir entre antígenos de gusano redondo, antígenos de gusano látigo y antígenos de gusano de gancho en un

mamífero. La especificidad para cada tipo de gusano es sorprendente porque todos de gusanos redondos, gusanos látigos y gusanos de gancho son nematodos relacionados, y se esperaría que un anticuerpo obtenido contra una proteína aislada de uno cualquiera de estos gusanos presente reacción cruzada con uno o más de los otros gusanos, antígenos de huésped u otros componentes de huésped.

Se determinó además que este anticuerpo puede usarse para capturar y detectar antígenos de gusano látigo en un mamífero tan sólo 9 días tras infectarse por primera vez el mamífero. Esta capacidad para detectar gusano látigo tan pronto tras la infección, y antes de la aparición de cualquier huevo en las heces del mamífero infectado, es sorprendente porque generalmente los huevos no aparecen en las heces de un huésped infeccioso hasta aproximadamente de cinco a ocho semanas tras infectarse el huésped.

Por tanto, la presente invención incluye métodos, dispositivos y kits que usan anticuerpos y/o fragmentos de los mismos para capturar específicamente y detectar y distinguir entre antígenos de gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho en un mamífero. La capacidad de la presente invención para detectar y diagnosticar gusano redondo incluso cuando también están presentes uno o más de otros tipos de gusanos permite al cuidador del mamífero la oportunidad de seleccionar de manera óptima un tratamiento para eliminar el gusano látigo del mamífero. Además, la capacidad de la presente invención para, en algunos casos, detectar gusano látigo tan sólo 9 días tras infectarse por primera vez el mamífero proporciona la posibilidad de que el cuidador pueda comenzar tal tratamiento antes de que el mamífero enferme gravemente. Una intervención antes de la aparición de huevos en las heces también reduciría enormemente o eliminaría la posibilidad de que se propague la infestación a otros animales o seres humanos.

II. Definiciones y usos de términos

El término “composiciones de la invención” se refiere a todos los ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos y mezclas que incluyen uno o más de esos ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos y uno o más de otros compuestos, que pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de gusano látigo en una muestra obtenida de un mamífero llevando a cabo el método de la presente invención que se describen explícitamente, se abarcan implícitamente o se dan a conocer de otro modo en el presente documento.

“Una muestra de un mamífero” en la que puede detectarse gusano látigo mediante la presente invención incluye todos los componentes corporales y extractos de los mismos, tales como cualquier fluido, sólido, célula o tejido, que pueden contener antígeno de gusano látigo. Por tanto, las muestras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a ser, heces, leche, sangre completa y partes de la misma, incluyendo suero, y además incluyen extractos tisulares, incluyendo tejido de glándula mamaria, intestino, hígado, corazón, pulmón, esófago, cerebro, músculo y ojo, por ejemplo. La muestra puede tomarse directamente del mamífero o la muestra puede tomarse de cualquier cosa que haya entrado en contacto con el mamífero. Por ejemplo, la muestra pueden ser deposiciones fecales recientes o en descomposición del mamífero. Como otro ejemplo, la muestra puede incluir tierra, barro, arena, material vegetal o cualquier otro material que puede mezclarse con componentes corporales que puede dejar atrás un mamífero, tales como heces, por ejemplo. Como tal, la muestra puede tomarse de una fuente del entorno, incluyendo tierra, material en descomposición o material fecal de bosques, granjas o zonas residenciales, incluyendo cajas de arena, patios, jardines, areneros, parques infantiles, parques y playas. Independientemente del origen o el contenido de la muestra, esta muestra se denomina algunas veces en el presente documento “muestra”, “muestra de mamífero”, “muestra de prueba” o “muestra sometida a prueba”.

Tal como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” es sinónimo de, y por tanto se usa de manera intercambiable con, “gen”, “ADN”, “ADNc”, “EST”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “poli(ácido nucleico)”, “ARN” y “ARNm”. Un ácido nucleico puede estar en forma bicatenaria o puede estar en forma monocatenaria. Además, un ácido nucleico o bien se aísla de manera natural, tal como de un gusano redondo, gusano látigo y/o gusano de gancho completo o de una parte de los mismos, por ejemplo, o bien se sintetiza artificialmente, o bien en un organismo huésped recombinante o bien mediante cualquier otro medio artificial conocido por el experto en la técnica, tal como empleando una técnica basada en PCR, creando un organismo transgénico que sintetiza el ácido nucleico, usando una máquina de síntesis de ADN, o mediante cualquier otra técnica molecular, por ejemplo.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” son términos sinónimos que se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. Un polipéptido, péptido y proteína de la presente invención puede o bien aislarse de manera natural, tal como de un gusano redondo, gusano látigo o gusano de gancho completo o de una parte de gusano redondo, gusano látigo o gusano de gancho por ejemplo, o bien sintetizarse artificialmente, o bien en un organismo huésped recombinante o bien mediante cualquier otro medio artificial conocido por el experto en la técnica.

El término “anticuerpo” o “anticuerpo de la presente invención” se refiere a cualquier anticuerpo que puede unirse específicamente a uno o más antígenos para el gusano particular sin unión a antígenos de los otros gusanos. Por ejemplo, anticuerpos frente al uno o más antígenos de gusano redondo pueden unirse específicamente al uno o más antígenos de gusano látigo pueden unirse específicamente a uno o más antígenos de gusano látigo, pero no a ningún antígeno de gusano redondo y gusano de gancho. Los anticuerpos de la presente invención pueden

obtenerse contra uno o más polipéptidos inmunogénicos de la presente invención. A menos que se mencione lo contrario, debe entenderse que el anticuerpo de la presente invención puede incluir una mezcla de dos o más tipos diferentes de anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una mezcla de dos tipos de anticuerpos, en la que uno de los dos tipos se une específicamente a un antígeno particular y el otro de los dos tipos se une específicamente a algún otro antígeno.

El término “primer anticuerpo” tal como se usa en el presente documento significa uno o más anticuerpos que pueden unirse específicamente a un coproantígeno de gusano redondo, pero no a un coproantígeno de gusano látigo o gusano de gancho.

El término “segundo anticuerpo” tal como se usa en el presente documento significa uno o más anticuerpos que pueden unirse específicamente a un coproantígeno de gusano látigo, pero no a un coproantígeno de gusano redondo o gusano de gancho.

El término “tercer anticuerpo” tal como se usa en el presente documento significa uno o más anticuerpos que pueden unirse específicamente a un coproantígeno de gusano de gancho, pero no a un coproantígeno de gusano látigo o gusano redondo.

El “polipéptido inmunogénico de la presente invención” y, más sencillamente, “el polipéptido de la presente invención”, es un inmunógeno contra el cual pueden obtenerse los anticuerpos de la presente invención. Todos los “polipéptidos de la presente invención” son inmunógenos y por tanto pueden usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un animal huésped para producir los anticuerpos de la presente invención. A menos que se mencione lo contrario, debe entenderse que el polipéptido de la presente invención puede ser un componente de una composición mixta de una pluralidad de componentes.

Un “inmunógeno” es cualquier agente, tal como el polipéptido inmunogénico de la presente invención, por ejemplo, que puede provocar una respuesta inmunitaria en un animal que se expone a ese agente.

El término “gusano redondo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a helmintos tales como gusanos redondos intestinales del orden *Ascaridida*, *que* incluye los géneros *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris*, *Ascaris*, *Anisakis* y *Pseudoterranova.* Por tanto, el término “gusano redondo”, tal como se usa en el presente documento, no se refiere a la totalidad del filo *Nematoda*. Por tanto, “gusano redondo” no incluye ningún miembro de los géneros *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Necator*, *Trichuris*, *Wuchereria*, *Brugia* o *Dirofilaria.*

Un “coproantígeno de gusano redondo” es cualquier producto de gusano redondo que está presente en las heces de un mamífero que tiene una infección por gusano redondo y al que pueden unirse específicamente uno o más de los anticuerpos de la memoria descriptiva. Por ejemplo, un coproantígeno de gusano redondo puede ser, pero no se limita a ser, uno o más de los polipéptidos de la memoria descriptiva. Los presentes inventores han determinado que una isoforma de 7 kD C-terminal novedosa de DIV6728, que es una proteína excretora/secretora de *T. canis*, está presente en heces de animales caninos con infección por *T. canis* tan sólo 38 días tras infectarse por primera vez los animales caninos por *T. canis.* Por tanto, un “coproantígeno de gusano redondo” puede ser esta isoforma de 7 kD C-terminal novedosa de DIV6728 (que se denomina en el presente documento “Copro6728”) que han observado los presentes inventores en heces de animal canino.

El término “gusano látigo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a helmintos tales como gusanos látigos intestinales de los géneros *Trichuris* y *Trichocephalus.* Por tanto, los gusanos látigos a modo de ejemplo incluyen *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris discolor* y *Trichocephalus trichiuris.* Además, el término “gusano látigo”, tal como se usa en el presente documento, no se refiere a la totalidad del filo *Nematoda*. Por ejemplo, “gusano látigo” no incluye ningún miembro de los géneros *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Necator*, *Toxocara*, *Toxascaris*, *Ascaris*, *Wuchereria*, *Brugia* o *Dirofilaria.*

Un “coproantígeno de gusano látigo” es cualquier producto de gusano látigo que está presente en las heces de un mamífero que tiene una infección por gusano látigo y al que pueden unirse específicamente uno o más de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, un coproantígeno de gusano látigo puede ser, pero no se limita a ser, uno o más de los polipéptidos de la invención.

El término “gusano de gancho”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a helmintos tales como gusano de gancho intestinal de los géneros *Ancylostoma*, *Necator* y *Uncinaria.* Por tanto, los gusanos de gancho a modo de ejemplo incluyen *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* y *Ancylostoma pluridentatum*, *Necator americanus* y *Uncinaria stenocephala.* Además, el término “gusano de gancho”, tal como se usa en el presente documento, no se refiere a la totalidad del filo *Nematoda*. Por ejemplo, “gusano de gancho” no incluye ningún miembro de los géneros *Trichuris*, *Trichocephalus Toxocara*, *Toxascaris*, *Ascaris*, *Wuchereria*, *Brugia* o *Dirofilaria.*

Un “coproantígeno de gusano de gancho” es cualquier producto de gusano de gancho que está presente en las heces de un mamífero que tiene una infección por gusano de gancho y al que pueden unirse específicamente uno o

más de los anticuerpos de la memoria descriptiva. Por ejemplo, un coproantígeno de gusano de gancho puede ser, pero no se limita a ser, uno o más de los polipéptidos de la memoria descriptiva. Los presentes inventores han determinado que una isoforma de 28 kDa N-terminal novedosa de ASP5, que es una proteína excretora/secretora de *Ancylostoma*, está presente en heces de animales caninos con infección por *Ancylostoma* tan sólo 9 días tras infectarse por primera vez los animales caninos por *Ancylostoma.* Por tanto, un "coproantígeno de gusano de gancho" puede ser esta isoforma de 28 kD N-terminal novedosa de ASP5 (que se denomina en el presente documento "CoproASP5") que han observado los presentes inventores en heces de animal canino.

"Específico para", "se une específicamente" y "se une de manera estable" significa que una composición particular de la invención, tal como un anticuerpo, polipéptido u oligonucleótido de la presente invención, por ejemplo, reconoce o se une a uno o más de otros agentes con mayor afinidad que a al menos otro agente. Como ejemplo, se dice que un anticuerpo de la presente invención es "específico para", "se une específicamente a" y "se une de manera estable a" antígenos de gusano látigo siempre que ese anticuerpo puede reconocer y unirse a esos antígenos de gusano redondo con mayor afinidad que a cualquier otro antígenos de un gusano parásito distinto de gusano redondo. Tal especificidad de unión puede someterse a prueba usando metodología bien conocida en la técnica, por ejemplo, ELISA o un radioinmunoensayo (RIA). Basándose en información observada referente a la especificidad de unión de una composición particular de la invención, el método de la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones que permiten que la composición se una a (y por tanto permiten la detección de tal unión a) un agente o agentes particulares, pero que no se una significativamente a otros agentes, mientras se mantienen esas condiciones. Como ejemplo, el método de la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones que permiten que un anticuerpo de la presente invención se una a (y por tanto permiten la detección de tal unión a) uno o más antígenos de gusano látigo presentes en una muestra particular, pero no significativamente a ningún antígeno de gusano de gancho o gusano látigo que puede estar presente en esa muestra, permitiendo así distinguir entre gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho.

"Detectar gusano redondo" significa detectar uno o más productos específicos de gusano redondo, incluyendo uno o más de los polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos de la presente memoria descriptiva, o uno o más antígenos de gusano redondo, o Copro6728, por ejemplo. La presencia de uno o más de tales productos de gusano redondo en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero tiene una infección por gusano redondo, independientemente de si también está presente cualquier organismo de gusano redondo completo o huevo del mismo en esa muestra. A la inversa, la ausencia de uno o más de tales productos de gusano redondo en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero no tiene una infección por gusano redondo.

"Detectar gusano látigo" significa detectar uno o más productos específicos de gusano látigo, incluyendo uno o más de los polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos de la presente invención, o uno o más antígenos de gusano látigo, por ejemplo. La presencia de uno o más de tales productos de gusano látigo en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero tiene una infección por gusano látigo, independientemente de si también está presente cualquier organismo de gusano látigo completo o huevo del mismo en esa muestra. A la inversa, la ausencia de uno o más de tales productos de gusano látigo en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero no tiene una infección por gusano látigo.

"Detectar gusano de gancho" significa detectar uno o más productos específicos de gusano de gancho, incluyendo uno o más de los polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos de la presente memoria descriptiva, o uno o más antígenos de gusano de gancho, o CoproASP5, por ejemplo. La presencia de uno o más de tales productos de gusano de gancho en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero tiene una infección por gusano de gancho, independientemente de si también está presente cualquier organismo de gusano de gancho completo o huevo del mismo en esa muestra. A la inversa, la ausencia de uno o más de tales productos de gusano de gancho en una muestra de un mamífero es indicativa de que el mamífero no tiene una infección por gusano de gancho.

"Aminoácido" se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos. Los residuos de aminoácido se abrevian de la siguiente manera: alanina es A o Ala; arginina es R o Arg; asparagina es N o Asn; ácido aspártico es D o Asp; cisteína es C o Cys; ácido glutámico es E o Glu; glutamina es Q o Gln; glicina es G o Gly; histidina es H o His; isoleucina es I o Ile; leucina es L o Leu; lisina es K o Lys; metionina es M o Met; fenilalanina es F o Phe; prolina es P o Pro; serina es S o Ser; treonina es T o Thr; triptófano es W o Trp; tirosina es Y o Tyr; y valina es V o Val. Excepto cuando se defina lo contrario en el presente documento, X o Xaa representa cualquier aminoácido. Otros aminoácidos relevantes incluyen, pero no se limitan a ser, 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina. En todos los casos, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido descrito o al que se hace referencia de otro modo en el presente documento se presenta en forma convencional en cuanto a que el residuo de aminoácido más a la izquierda, o primero, de la secuencia es el residuo N-terminal y el residuo de aminoácido más a la derecha, o último, de la secuencia es el residuo C-terminal.

Una "variante conservativa" de cualquier secuencia de ácido nucleico particular incluye cualquier secuencia que tiene una o más sustituciones de codón degeneradas con respecto a esa secuencia de ácido nucleico particular, cualquier secuencia que tiene una o más sustituciones, inserciones y deleciones de nucleótido con respecto a esa secuencia de ácido nucleico particular, y la secuencia complementaria de ese ácido nucleico particular y las variantes conservativas de esa secuencia complementaria. Las variantes conservativas de una secuencia de ácido

nucleico particular tienen preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente tienen una identidad de al menos aproximadamente el 90%, e incluso más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente el 95-99%, con respecto a esa secuencia de ácido nucleico particular. Las variantes conservativas de una secuencia de ácido nucleico particular pueden sintetizarse artificialmente o pueden aislarse en su forma natural de un organismo.

Una "variante conservativa" de cualquier secuencia de polipéptido particular es cualquier polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que varía con respecto a la secuencia de aminoácidos de ese polipéptido particular pero todavía conserva las propiedades de unión específica de ese polipéptido particular, de tal manera que un anticuerpo de la presente invención que se obtiene contra el polipéptido particular puede unirse específicamente al polipéptido variante. Por tanto, por ejemplo, una variante conservativa de un polipéptido particular puede tener una o más sustituciones, deleciones, adiciones e inserciones de aminoácido con respecto a ese polipéptido particular. Por ejemplo, una variante conservada de un polipéptido particular puede tener 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, o 5 o menos, sustituciones de aminoácido conservadas con respecto a ese polipéptido particular. Las variantes conservativas de un polipéptido particular tienen preferiblemente, pero no esencialmente, una identidad de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente tienen una identidad de al menos aproximadamente el 90%, e incluso más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente el 91-99%, con respecto a ese polipéptido particular. Una identidad en porcentaje para cualquier secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos objeto (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento) con respecto a otra secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos "diana" puede determinarse de la siguiente manera. En primer lugar, puede compararse una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos diana de la invención y alinearse con una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos objeto, usando el programa BLAST 2 Sequences (B12seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN y BLASTP (por ejemplo, versión 2.0.14). La versión independiente de BLASTZ puede obtenerse en www.ncbi.nlm.nih.gov. Pueden encontrarse instrucciones que explican cómo usar BLASTZ, y específicamente el programa B12seq, en el archivo "readme" que acompaña a BLASTZ. Los programas también se describen en detalle por Karlin *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2264; Karlin *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873; y Altschul *et al.* (1997) Nucl. Acids Res. 25:3389.

"CoproASP5" se refiere a un fragmento de 28 kD N-terminal de ASP5 encontrado en heces de mamífero.

"Copro6728" se refiere a una porción 7 kD C-terminal de DIV6728 encontrada en heces de mamífero. En una realización específica, copro6728 no incluye el extremo C-terminal de DIV6728 de longitud completa.

B12seq realiza una comparación entre la secuencia objeto y una secuencia diana usando el algoritmo o bien BLASTN (usado para comparar secuencias de ácido nucleico) o bien BLASTP (usado para comparar secuencias de aminoácidos). Normalmente, se usan los parámetros por defecto de una matriz de puntuación BLOSUM62, coste de existencia de hueco de 11 y coste de extensión de 1, un tamaño de palabra de 3, un valor esperado de 10, un coste por residuo de 1 y una razón lambda de 0,85, cuando se realizan alineaciones de secuencias de aminoácidos. El archivo generado contiene regiones alineadas de homología entre la secuencia diana y la secuencia objeto. Una vez alineadas, se determina la longitud contando el número de nucleótidos o residuos de aminoácido consecutivos (es decir, excluyendo huecos) de la secuencia diana que se alinean con la secuencia de la secuencia objeto comenzando con cualquier posición correspondiente y terminando con cualquier otra posición correspondiente. Una posición correspondiente es cualquier posición en la que está presente un nucleótido o residuo de aminoácido idéntico tanto en la secuencia diana como en la objeto. Pueden insertarse huecos de uno o más residuos en una secuencia diana u objeto para maximizar alineaciones de secuencias entre dominios estructuralmente conservados (por ejemplo, hélices α, láminas β y bucles).

La identidad en porcentaje a lo largo de una longitud particular se determina contando el número de posiciones correspondientes a lo largo de esa longitud particular, dividiendo ese número entre la longitud y multiplicando el valor resultante por 100. Por ejemplo, si (i) se compara una secuencia diana de 500 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos objeto, (ii) el programa B12seq presenta 200 aminoácidos de la secuencia diana alineados con una región de la secuencia objeto en la que los aminoácidos primero y último de esa región de 200 aminoácidos son correspondencias, y (iii) el número de correspondencias a lo largo de esos 200 aminoácidos alineados es de 180, entonces la secuencia diana de 500 aminoácidos contiene una longitud de 200 y una identidad de secuencia a lo largo de esa longitud del 90% (es decir, 180/200x100=90). Se apreciará que una secuencia diana de ácido nucleico o de aminoácidos que se alinea con una secuencia objeto puede dar como resultado muchas longitudes diferentes teniendo cada longitud su propia identidad en porcentaje. Se indica que el valor de identidad en porcentaje puede redondearse al decimal más próximo. Por ejemplo, 78,11, 78,12, 78,13 y 78,14 se redondean a 78,1, mientras que 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 y 78,19 se redondean a 78,2. También se indica que el valor de longitud siempre será un número entero.

Variantes conservativas de una secuencia de polipéptido particular pueden sintetizarse artificialmente o pueden aislarse en su forma natural de un organismo, incluyendo de un organismo de gusano redondo, tal como *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, y *Ascaris*, de un organismo de gusano látigo, tal como *Trichuris* y *Trichocephalus* y de un organismo de gusano de gancho, tal como *Ancylostoma*, *Necator* y *Uncinaria* por ejemplo. En un ejemplo específico, no limitativo, para gusano redondo, el polipéptido de la invención que tiene una secuencia de aminoácidos

correspondiente a SEQ ID NO: 27 mostrada a continuación es una variante conservativa del polipéptido de la presente invención que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 26 en cuanto a que SEQ ID NO: 27 es idéntica en más del 95% a SEQ ID NO: 26 a lo largo de una alineación de 126 aminoácidos. Más generalmente, cada una de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 son variantes conservadas entre sí. También debe entenderse que la presente invención contempla otras variantes conservadas de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 tal como se describe en el presente documento, pero el experto en la técnica reconocerá que todas estas variantes contempladas son demasiado numerosas como para indicarlas. El experto en la técnica también reconocerá que esas variantes incluyen, pero no se limitan a, las que tienen una o más sustituciones de residuos de aminoácido básicos, una o más sustituciones de residuos de aminoácido ácidos, una o más sustituciones de residuos de aminoácido polares, una o más sustituciones de residuos de aminoácido hidrófobos, una o más sustituciones de residuos de aminoácido aromáticos, y una o más sustituciones de residuos de aminoácido pequeños. (Residuos de aminoácido “básicos” son K, R y H. Residuos de aminoácido “ácidos” son D y E. Residuos de aminoácido “polares” son N y Q. Aminoácidos “hidrófobos” son I, L y V. Residuos de aminoácido “aromáticos” son F, Y y W. Aminoácidos “pequeños” son G, S, A, T y M).

III. Ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención

Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención se describen en detalle en las solicitudes provisionales: “Methods, Devices, Kits And Compositions For Detecting Whipworm”, solicitud con n.º de serie: 61/128.077, presentada el 19 de mayo de 2008; “Methods, Devices, Kits And Compositions For Detecting Roundworm”, solicitud con n.º de serie 61/128.079, presentada el 19 de mayo de 2008; “Methods, Devices, Kits And Compositions For Detecting Roundworm”, solicitud con n.º de serie 61/128.076, presentada el 19 de mayo de 2008; “Methods, Devices, Kits And Compositions For Detecting Roundworm”, solicitud con n.º de serie 61/128.099, presentada el 19 de mayo de 2008; “Compositions, Devices, Kits and Methods for Detecting Hookworm”, solicitud con n.º de serie 61/122.254, presentada el 12 de diciembre de 2008; y las solicitudes de utilidad: “Roundworm Coproantigen Detection”, solicitud con n.º de serie 11/763.592, presentada el 15/6/2007 y “Device, Kit and Method for Hookworm Antigen Detection”, solicitud con n.º de serie 11/763.583, presentada el 15/6/2007, “Methods, Devices, Kits, Compositions for Detecting Roundworm” presentada simultáneamente con el presente documento.

En un intento por identificar composiciones que pueden usarse para confirmar la presencia o ausencia de gusano redondo en una muestra fecal y para distinguir gusano redondo de otras infecciones por gusanos parásitos, se diseñó una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos, se sintetizaron y se usaron en reacciones de 5’ RACE, 3’RACE y RT-PCR que incluyeron ARN total aislado o bien de *Toxocara canis* adulto completo o bien de *Toxocara cati* adulto completo. Como resultado de estos esfuerzos, se dedujo una secuencia de ADNc de 469 nucleótidos de *Toxocara canis* (identificada en el presente documento como SEQ ID NO: 25), y se dedujo una secuencia de ADNc de 548 nucleótidos de *Toxocara cati* (identificada en el presente documento como SEQ ID NO: 26). (Búsquedas en BLAST que se llevaron a cabo usando SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 indicaron que estas secuencias codifican probablemente para miembros de familias de inhibidor de serina proteasa que se identificaron por primera vez en *Ascaris*, pero que hasta ahora no se habían identificado ni en *T. canis* ni en *T. cati*).

En un intento por identificar composiciones que puedan usarse para confirmar la presencia o ausencia de gusano látigo en una muestra fecal y para distinguir gusano látigo de otras infecciones por gusanos parásitos, se diseñó una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos, se sintetizaron y se usaron en reacciones de 5’ RACE, 3’RACE y RT-PCR que incluyeron ARN total aislado de *Trichuris vulpis* adulto completo. Como resultado de estos esfuerzos, se dedujeron una secuencia de ADNc de 1210 nucleótidos y una secuencia de ADNc de 1059 nucleótidos (identificadas en el presente documento como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). (Búsquedas en BLAST que se llevaron a cabo usando SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 indicaron que estas secuencias codifican probablemente para porina, que es una proteína excretora/secretora de gusano látigo principal que se ha descrito en el parásito de ratón *Trichuris muris* y el parásito humano *Trichuris trichiuria*, pero que hasta ahora no se habían identificado en *Trichuris vulpis*).

Anteriormente, Zhan y colaboradores describieron la identificación molecular y caracterización parcial de ASP-5, que es una proteína excretora/secretora de *Ancylostoma* (véase Zhan *et al.*, International Journal for Parasitology 33:897-907 (2003)). En sus estudios, el grupo de Zhan describió una única forma de la proteína ASP-5 que tiene una masa de aproximadamente 56 kDa, secretada a partir de parásitos cultivados *in vitro*.

La proteína ASP-5, que incluye una cola de His6 N-terminal (SEQ ID NO: 33), puede codificarse por la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 31:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCA
GCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA
GCTCACCACTTGTCCAGGAAATGATCTAACAGATGCTGAACGCACACTGCTAACTA
GGGTGCACAATTCCATTCGACGGGAAATAGCGCAAGGAGTTGCAAACAACTACCA
TGGTGGTAAACTGCCTGCTGGAAAGAACATATACAGGATGAGATACAGCTGTGAG
CTGGAACAGGCTGCTATTGATGCTAGTCAAACCTTCTGTTCCGCATCATTGGAGGA
ACCACAGAAATATGGACAAAACATCCAAGCATACGTCACACCATCTATAATCGCT
CGCCCGAAAAACGACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCTGCCTGTTAT
CTACTACGGCCAACGCGACGCGGCCAACAAGTTCACCGATCCGCGCTTGTACACAT
TTGCAAACCTCGCCTACGACAAGAACACTGCACTTGGCTGTCACTATGCGAAATGT
CAAGGCCCTGACAGAATCGTCATTAGTTGCATGTACAACAACGTCGTTCCTGACAA
CGCTGTGATCTACGAGCCAGGAACTGCTTGCGTAAAAGATCAGGACTGCACTACTT
ATCCTCAGTCCACATGCAAGGACAGCCTTTGCATTATTCCTACGCCACATCCACCA
AATCCACCAAATCCACCACCTGCAATGTGTCCAAACGCTGAAATGACTGATGCAGC
ACGAAAGAAGGTCCTCGACATGCACAACTGGCGCAGATCGCAGCTCGCTCTGGGA
AACGTTCAAAACGGGAAAAATGCTTACAACTGCCCCACTGCAACAGACATGTACA
AGATGGAATATGATTGCGACCTCGAGAACAGCGCTCTAGCGTATGCAAAGCAATG
TAGTCTCGTTGGTTCAGCAGAAGGAACTCGTCCAGGAGAAGGCGAGAATGTCCAC
AAAGGCGCTCTCGTAACCGATCCGGAGGCTGCAGTTCAGACCGCAGTTCAAGCAT
GGTGGAGTCAAATCTCACAAAATGGACTCAATGCACAGATGAAATTCACTGCTTTC
TTGAAGGACAAGCCTGACGCTCCGACAGCGTTTACACAGATGGCGTGGGCCAAAT
CCGTAAAGCTTGGATGTGCTGTCTCTAATTGTCAGGCAGATACCTTCACCGTCTGT
AGATACAAAGCTGCCGGAAACATCGTGGGCGAATTCATCTATACCAAGGGAAATG
TATGCGACGCCTGTAAAGCCACATGCATTACCGCGGAAGGTCTTTGCCCAACGCCT
TGAGCGGCCGC (SEQ ID NO: 31)

En un esfuerzo por identificar herramientas para capturar y detectar antígeno de gusano de gancho y/o gusano de gancho en mamíferos con infección por gusano de gancho, los presentes inventores han determinado que una proteína modificada de aproximadamente 28 kDa, en vez de la versión de 56 kDa, está presente en las heces de animales caninos que tienen infección por *Ancylostoma*. (Esta versión de 28 kDa de ASP5 se denomina en el presente documento “CoproASP5”; la detección de CoproASP5 en heces de animales caninos con infección por *Ancylostoma* se describe en la sección de ejemplos incluida en el presente documento). Por tanto, en un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona polipéptidos que pueden usarse para generar anticuerpos que pueden usarse para capturar específicamente y detectar CoproASP5. Un polipéptido de este tipo que puede usarse para generar anticuerpos que pueden usarse para unirse a CoproASP5 se denomina polipéptido ASPS-1, que puede codificarse por la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
AGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTC
GAGCTCACCACTTGTCCAGGAAATGATCTAACAGATGCTGAACGCACACTGCTA
ACTAGGGTGCACAATTCCATTCGACGGGAAATAGCGCAAGGAGTTGCAAACAAC
TACCATGGTGGTAAACTGCCTGCTGGAAAGAACATATACAGGATGAGATACAGC
TGTGAGCTGGAACAGGCTGCTATTGATGCTAGTCAAACCTTCTGTTCCGCATCAT
TGGAGGAACCACAGAAATATGGACAAAACATCCAAGCATACGTCACACCATCTA
TAATCGCTCGCCCGAAAAACGACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCT
GCCTGTTATCTACTACGGCCAGCGCGACGCGGCCAACAAGTTTACGGATCCGCGC
TTGTACACATTTGCAAACCTCGCCTACGACAAGAACACTGCACTTGGCTGTCACT
ATGCGAAATGTCAAGGCCCTGACAGAATCGTCATTAGTTGCATGTACAACAACGT
CGTTCCTGACAACGCAGTGATCTACGAGCCTGGAACTGCTTGCGTAAAAGATGCG
GACTGCACTACTTATCCTCAGTCCACATGCAAGGACAGCCTTTGCATTATTCCTA
CGCCACATCCACCAAATCCACCAAATCCACCACCAGCAATGAGTCCATGAGCGG
CCGC (SEQ ID NO: 32)

Un experto en la técnica apreciará que debido a la degeneración del código genético, secuencias de ácido nucleico distintas de SEQ ID NO: 32 pueden codificar para el polipéptido de SEQ ID NO: 34 si se realizan sustituciones de codones apropiadas (silenciosas).

El análisis de las secuencias de gusano redondo correspondientes a SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 indicó que cada una de estas secuencias de gusano redondo contiene un marco de lectura abierto (ORF) grande. Específicamente, el ORF grande de SEQ ID NO: 24 corresponde a los nucleótidos 21 a 446 de SEQ ID NO: 24 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MLPITFLLAIIVGAAVAHRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGEQPCPMMCRPPSCECM
AGKGLRRTADGRCVPEAQCPKRMVKRDEKCGPNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCP
RMCKPPGCECPASEGFVRNDKGECIKFDDCPK (SEQ ID NO:26).

Además, el ORF grande de SEQ ID NO: 25 corresponde a los nucleótidos 21 a 446 de SEQ ID NO: 25 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MLPLTFLLAFIVGAAVAHRKCGPNEEWTECTGCEMKCGEGETPCPMMCRPPSCECM
AGKGLRRTPDGRCVPEAQCPKHMVKRDEKCGKNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPK
MCKPPGCECPASEGFVRNDKHECIKFDDCPK (SEQ ID NO:27).

SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 se exponen en la solicitud provisional con n.º de serie 61/128.076 presentada el 19 de mayo de 2008.

El análisis de las secuencias de gusano látigo correspondientes a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 indicó que cada una de estas secuencias de gusano látigo contiene un ORF grande. Específicamente, el ORF grande de SEQ ID NO: 1 corresponde a los nucleótidos 32 a 1147 de SEQ ID NO: 1 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano látigo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRLVFHAVIYLTLGFLTDAVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEG
RGCVPPYGEQHFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTH
PLHFPIQPQPPVGQCPPSKPRIPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLV
PGQGERPGNCPNEPRIRGTKYDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPG
HCPPIPADVGSARYCDTDRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSR
PRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGT
KYDCRRDDDCDGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ ID NO:3).

Además, el ORF grande de SEQ ID NO: 2 corresponde a los nucleótidos 1 a 1059 de SEQ ID NO: 2 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano látigo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQDFEVVKPG
HCPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPSK
PRVPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIR
GTKYDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSARYCDT
DRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANC
PDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQK
CCYTTEGRECVHGIWP (SEQ ID NO:4).

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO; 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9 se exponen en la solicitud provisional con n.º de serie 61/128.077 presentada el 19 de mayo de 2008.

El análisis de las secuencias de gusano redondo correspondientes a SEQ ID NO: 1 0 y SEQ ID NO: 11 indicó que cada una de estas secuencias contiene un ORF grande. Específicamente, tal como se muestra, el ORF grande de SEQ ID NO: 10 corresponde a los nucleótidos 2 a 616 de SEQ ID NO: 11 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

KKIYGVAASRRRRHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQDKIMH
YYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEE
ALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKKIYGVAASRRRRHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKE
ELLQMKKDGKSKKELQDKIMHYYEHLEGMLLALCILY (SEQ ID NO:12).

Además, el ORF grande de SEQ ID NO: 11 corresponde a los nucleótidos 1 a 486 de SEQ ID NO: 11 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

IYGVAASRRRRHHFTLEKSLDTHLKWLSHEQKEELLKMKKDGKSKKELQDKVMHF
YEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEDA
LHAVTDEEKKQHIAEFGPACKEIFGVPIDVRHKRDPYTNMTPDEVAEGLRS (SEQ ID
NO:13).

SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16 se exponen en la solicitud provisional con n.º de serie 61/128.079 presentada el 19 de mayo de 2008.

El análisis de las secuencias de gusano redondo correspondientes a SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 indicó que cada una de estas secuencias de gusano redondo contiene un marco de lectura abierto (ORF) grande. Específicamente, el ORF grande de SEQ ID NO: 17 corresponde a los nucleótidos 28 a 456 de SEQ ID NO: 17 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MLSVLALFALITFAVAGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSP
GRGMRRTNDGRCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNC
RPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:19).

Además, el ORF grande de SEQ ID NO: 2 corresponde a los nucleótidos 29 a 457 de SEQ ID NO: 18 y se predice que codifica para un polipéptido de gusano redondo que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MLSVLALFALITFAVADPKSCGPNEVWTECTGCELKCGQDEDTPCTLNCRPPSCECS
PGRGMRRTDDGRCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRN
CRPPGCECVAGAGFVRDAAGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:20).

SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NO: 23 se exponen en la solicitud provisional con n.º de serie 61/128.099 presentada el 19 de mayo de 2008.

El análisis de las secuencias de gusano de gancho correspondientes a SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 indicó que cada una de estas secuencias de gusano de gancho contiene un marco de lectura abierto (ORF) grande. Específicamente, el ORF grande de SEQ ID NO: 31 se predice que codifica para un polipéptido de gusano de gancho que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELTTCPGNDLTDAERTLLT
RVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIYRMRYSCELEQAAIDASQTFCSASLEEP
QKYGQNIQAYVTPSIIARPKNDLLEDAVKQWYLPVIYYGQRDAANKFTDPRLYTFAN
LAYDKNTALGCHYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPDNAVIYEPGTACVKDQDCTTYPQ
STCKDSLCIIPTPHPPNPPNPPPAMCPNAEMTDAARKKVLDMHNWRRSQLALGNVQ
NGKNAYNCPTATDMYKMEYDCDLENSALAYAKQCSLVGSAEGTRPGEGENVHKG
ALVTDPEAAVQTAVQAWWSQISQNGLNAQMKFTAFLKDKPDAPTAFTQMAWAKS
VKLGCAVSNCQADTFTVCRYKAAGNIVGEFIYTKGNVCDACKATCITAEGLCPTP
(SEQ ID NO:33).

Los primeros 38 aminoácidos de SEQ ID NO: 33 se derivan de un vector de clonación, el experto en la técnica apreciará que esta porción puede omitirse o sustituirse por otras parejas de fusión adecuadas.

Además, el ORF grande de SEQ ID NO: 32 se predice que codifica para un polipéptido de gusano de gancho que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELTTCPGNDLTDAERTLLT
RVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIYRMRYSCELEQAAIDASQTFCSASLEEP
QKYGQNIQAYVTPSIIARPKNDLLEDAVKQWYLPVIYYGQRDAANKFTDPRLYTFAN
LAYDKNTALGCHYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPDNAVIYEPGTACVKDADCTTYPQ
STCKDSLCIIPTPHPPNPPNPPPAMSP (SEQ ID NO:34).

Los polipéptidos de la presente invención se codifican por ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que corresponde a la totalidad o a porciones de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 y todas las variantes conservativas de estas secuencias. Por tanto, debe entenderse que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención es variable.

Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a la totalidad o a una porción de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 o la totalidad o una porción de una variante conservativa de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.

En un ejemplo específico, el polipéptido de gusano redondo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MHRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGEQPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRTADGRCVP
EAQCPKRMVKRDEKCGPNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFV
RNDKGECIKFDDCPK (SEQ ID NO:28).

En un ejemplo específico, el polipéptido de gusano látigo de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQHFEVVKP
GHCPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPS
KPRIPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIR
GTKYDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSARYCDT
DRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANC
PDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQK
CCYTTEGRECVHGIWP (SEQ ID NO:5).

En otro ejemplo específico, el polipéptido de gusano redondo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQDKIMHYYEHLEGDAKH
EATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEEALHAVTDEEKK
QHIAEFGPACKKIYGVAAS (SEQ ID NO: 14).

En otro ejemplo específico, el polipéptido de gusano redondo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTNDGRCIP
ASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFV
RDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO: 21).

En otro ejemplo específico, el polipéptido de gusano de gancho incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga a una secuencia representada por SEQ ID NO: 34.

Los 125 residuos de aminoácido que siguen al residuo de metionina N-terminal del polipéptido de gusano redondo correspondiente a SEQ ID NO: 28 representan específicamente los residuos de aminoácido 18 a 142 de SEQ ID NO: 26. La metionina N-terminal se añadió artificialmente al extremo N-terminal de este polipéptido llevando a cabo

una técnica de clonación convencional. Anticuerpo obtenido contra el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 28 fue útil para detectar antígeno de gusano redondo. Dado que la metionina N-terminal se añadió artificialmente, y no se piensa que exista de manera natural en *Toxocara* (el residuo que está inmediatamente antes que el residuo de histidina en la posición 18 en cada una de SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 es alanina, y no metionina), por tanto se contempla que el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácido 18 a 142 de SEQ ID NO: 26, o, más específicamente:

HRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGEQPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRTADGRCVPE AQCPKRMVKRDEKCGPNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFVR NDKGECIKFDDCPK (SEQ ID NO:29).

Los 353 residuos de aminoácido que siguen al residuo de metionina N-terminal del polipéptido de gusano látigo correspondiente a SEQ ID NO: 5 representan específicamente los residuos de aminoácido 20 a 353 de SEQ ID NO: 3. La metionina N-terminal se añadió artificialmente al extremo N-terminal de este polipéptido llevando a cabo una técnica de clonación convencional. Anticuerpo obtenido contra el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 5 fue útil para detectar antígeno de gusano látigo. Dado que la metionina N-terminal se añadió artificialmente, y no se piensa que exista de manera natural en *Trichuris vulpis* (el residuo que está inmediatamente antes que el residuo de valina en la posición 20 en SEQ ID NO: 3 es alanina), por tanto se contempla que el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácido 20 a 353 de SEQ ID NO: 3, o, más específicamente:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQHFEVVKPG HCPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPSK PRIPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIRG TKYDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSARYCDTD RDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCP DPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQKC CYTTEGRECVHGIWP (SEQ ID NO:6).

En otro ejemplo específico, el polipéptido de gusano látigo de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQDFEVVKPG HCPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPSKPR VPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGTK YDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSARYCDTDRDC DGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEK CCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQKCCYTTE GRECVHGIWP (SEQ ID NO:7).

Los 353 residuos de aminoácido que siguen al residuo de metionina N-terminal del polipéptido de gusano látigo correspondiente a SEQ ID NO: 7 representan específicamente los residuos de aminoácido 1 a 353 de SEQ ID NO: 4. La metionina N-terminal se añadió artificialmente al extremo N-terminal de este polipéptido llevando a cabo una técnica de clonación convencional. Anticuerpo obtenido contra el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 7 fue útil para detectar antígeno de gusano látigo. Dado que la metionina N-terminal se añadió artificialmente, por tanto se contempla que el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácido 1 a 353 de SEQ ID NO: 4, o, más específicamente:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQDFEVVKPGH CPAIPAVTGMANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPSKPRV PGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGTKY DCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSARYCDTDRDCD GPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCC DTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQKCCYTTEGR ECVHGIWP (SEQ ID NO:8).

Los 129 residuos de aminoácido que siguen al residuo de metionina N-terminal del polipéptido de gusano redondo

correspondiente a SEQ ID NO: 14 representan específicamente los residuos de aminoácido 14 a 142 de SEQ ID NO: 12. La metionina N-terminal se añadió artificialmente al extremo N-terminal de este polipéptido llevando a cabo una técnica de clonación convencional. Anticuerpo obtenido contra el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 14 fue útil para detectar antígeno de gusano redondo. Dado que la metionina N-terminal se añadió artificialmente, y no se piensa que exista de manera natural en *Toxocara* (el residuo que está inmediatamente antes que el residuo de histidina en la posición 14 en cada una de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 es arginina, y no metionina), por tanto se contempla que el polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácido 14 a 142 de SEQ ID NO: 12, o, más específicamente:

HHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQDKIMHYYEHLEGDAKHE ATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEEALHAVTDEEKKQ HIAEFGPACKKIYGVAAS (SEQ ID NO: 15).

Con 128 aminoácidos, la proteína de gusano redondo DIV6728 (SEQ ID NO: 21) tiene aproximadamente 14 kD de tamaño y tiene un pI teórico de aproximadamente 6,54. Esta proteína pertenece a la superfamilia de TIL, que es un grupo de inhibidores de serina proteasa. En un esfuerzo por identificar herramientas para capturar y detectar gusano redondo y/o antígeno de gusano redondo en mamíferos con infección por gusano redondo, los presentes inventores han determinado que sólo está presente una porción truncada (de aproximadamente 7 kDa) de la proteína de longitud completa (14 kDa), y por tanto no la versión de 14 kDa, en las heces de animales caninos que tienen infección por *T. canis*. (Esta porción truncada de 7 kDa de DIV6728 se denomina en el presente documento "Copro6728"; la detección de Copro6728 en heces de animales caninos con infección por *T. canis* se describe en la sección de ejemplos incluida en el presente documento). Por tanto, en un aspecto la presente memoria descriptiva proporciona polipéptidos que pueden usarse para generar anticuerpos que pueden usarse para capturar específicamente y detectar Copro6728.

Los 127 residuos de aminoácido que siguen al residuo de metionina N-terminal del polipéptido de gusano redondo correspondiente a SEQ ID NO: 21 representan específicamente los residuos de aminoácido 17 a 143 de SEQ ID NO: 19. La metionina N-terminal se añadió artificialmente al extremo N-terminal de este polipéptido llevando a cabo una técnica de clonación convencional. También tal como se describe a lo largo de la sección de ejemplos, anticuerpo obtenido contra el polipéptido correspondiente a SEQ ID NO: 21 fue útil para detectar antígeno de gusano redondo. Dado que la metionina N-terminal se añadió artificialmente, y no se piensa que exista de manera natural en *Toxocara* (el residuo que está inmediatamente antes que el residuo de glicina en la posición 17 en cada una de SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 es alanina, y no metionina), por tanto se contempla que el polipéptido de la presente memoria descriptiva puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácido 17 a 143 de SEQ ID NO: 19, o, más específicamente:

GPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTNDGRCIPA SQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVR DAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO: 22).

Además, en la figura 14 se muestra una alineación de SEQ ID NO: 28 (principalmente secuencia derivada de *Toxocara canis*; siendo la única excepción el residuo de metionina N-terminal) con SEQ ID NO: 27 (secuencia derivada de *Toxocara cati*). Dado que anticuerpo obtenido contra un polipéptido que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 28 fue útil para detectar *Toxocara cati*, se contempla adicionalmente que el polipéptido de la presente memoria descriptiva puede tener la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 30, en la que X en la posición 1 es M o está ausente, X en la posición 2 es L o está ausente, X en la posición 3 es P o está ausente, X en la posición 4 es L o está ausente (o X en la posición 4 es I, que ocupa la posición 4 de SEQ ID NO: 26), X en la posición 5 es T o está ausente, X en la posición 6 es F o está ausente, X en la posición 7 es L o está ausente, X en la posición 8 es L o está ausente, X en la posición 9 es A o está ausente, X en la posición 10 es F o está ausente (o X en la posición 10 es I, que ocupa la posición 10 de SEQ ID NO: 26), X en la posición 11 es I o está ausente, X en la posición 12 es V o está ausente, X en la posición 13 es G o está ausente, X en la posición 14 es A o está ausente, X en la posición 15 es A o está ausente, X en la posición 16 es V o está ausente, X en la posición 16 es M o A, X en la posición 35 es I o M, X en la posición 39 es Q o E, X en la posición 42 es Q o T, X en la posición 65 es A o P, X en la posición 78 es R o H, X en la posición 88 es P o K, X en la posición 111 es R o K, y X en la posición 132 es G o H.

Además, en la figura 5 se muestra una alineación de SEQ ID NO: 3 con respecto a SEQ ID NO: 4. Se contempla adicionalmente que el polipéptido de la presente memoria descriptiva puede tener la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 9, en la que X en la posición 1 es M o está ausente, X en la posición 2 es R o está ausente, X en la posición 3 es L o está ausente, X en la posición 4 es V o está ausente, X en la posición 5 es F o está ausente, X en la posición 6 es H o está ausente, X en la posición 7 es A o está ausente, X en la posición 8 es V o está ausente, X en la posición 9 es I o está ausente, X en la posición 10 es Y o está ausente, X en la posición 11 es L o está ausente, X en la posición 12 es T o está ausente, X en la posición 13 es L o está ausente, X en la posición 14 es G o está ausente, X en la posición 15 es F o está ausente, X en la posición 16 es L o está ausente, X

en la posición 17 es T o está ausente, X en la posición 18 es D o está ausente, X en la posición 19 es A o está ausente (o X en la posición 19 es M, que ocupa la posición 19 de SEQ ID NO: 5), X en la posición 69 es H o D, X en la posición 136 es I o V y X en la posición 172 es P o A.

Además, en la figura 8 se muestra una alineación de SEQ ID NO: 14 (principalmente secuencia derivada de *Toxocara canis*; siendo la única excepción el residuo de metionina N-terminal) con SEQ ID NO: 13 (secuencia derivada de *Toxocara cati*). Dado que anticuerpo obtenido contra un polipéptido que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 14 fue útil para detectar *Toxocara cati*, se contempla adicionalmente que el polipéptido de la presente memoria descriptiva puede tener la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 16, en la que X en la posición 1 es I o está ausente, X en la posición 2 es Y o está ausente, X en la posición 3 es G o está ausente, X en la posición 4 es V o está ausente, X en la posición 5 es A o está ausente, X en la posición 6 es A o está ausente, X en la posición 7 es S o está ausente, X en la posición 8 es R o está ausente, X en la posición 9 es R o está ausente, X en la posición 10 es R o está ausente, X en la posición 11 es R o M, X en la posición 18 es N o K, X en la posición 37 es Q o K, X en la posición 52 es I o V, X en la posición 55 es Y o F, X en la posición 110 es E o D, X en la posición 133 es K o E, X en la posición 135 es Y o F, X en la posición 138 es A o P, X en la posición 139 es A o I, X en la posición 140 es S o D, X en la posición 141 es V o está ausente, X en la posición 142 es R o está ausente, X en la posición 143 es H o está ausente, X en la posición 144 es K o está ausente, X en la posición 145 es R o está ausente, X en la posición 146 es D o está ausente, X en la posición 147 es P o está ausente, X en la posición 148 es Y o está ausente, X en la posición 149 es T o está ausente, X en la posición 150 es N o está ausente, X en la posición 151 es M o está ausente, X en la posición 152 es T o está ausente, X en la posición 153 es P o está ausente, X en la posición 154 es D o está ausente, X en la posición 155 es E o está ausente, X en la posición 156 es V o está ausente, X en la posición 157 es A o está ausente, X en la posición 158 es E o está ausente, X en la posición 159 es G o está ausente, X en la posición 160 es L o está ausente, X en la posición 161 es R o está ausente, y X en la posición 162 es S o está ausente.

Además, en la figura 11 se muestra una alineación de SEQ ID NO: 21 (principalmente secuencia derivada de *Toxocara canis*; siendo la única excepción el residuo de metionina N-terminal) con SEQ ID NO: 20 (secuencia derivada de *Toxocara cati*). Dado que anticuerpo obtenido contra un polipéptido que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 21 fue útil para detectar *Toxocara cati*, se contempla adicionalmente que el polipéptido de la presente memoria descriptiva puede tener la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 23, en la que X en la posición 1 está ausente o es M, X en la posición 2 está ausente o es L, X en la posición 3 está ausente o es S, X en la posición 4 está ausente o es V, X en la posición 5 está ausente o es L, X en la posición 6 está ausente o es A, X en la posición 7 está ausente o es L, X en la posición 8 está ausente o es F, X en la posición 9 está ausente o es A, X en la posición 10 está ausente o es L, X en la posición 11 está ausente o es I, X en la posición 12 está ausente o es T, X en la posición 13 está ausente o es F, X en la posición 14 está ausente o es A, X en la posición 15 está ausente o es V, X en la posición 16 es M o A, X en la posición 17 es G o D, X en la posición 19 es E o K, X en la posición 42 es N o D, X en la posición 66 es N o D, y X en la posición 132 es E o A.

Un polipéptido de la presente invención puede tener la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 38, en la que el aminoácido en la posición 54 es E o A. En la invención se incluyen anticuerpos que se unen específicamente a este polipéptido.

Dado que los primeros 38 residuos de aminoácido del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 34 no se derivaron de *Ancylostoma* (es decir, son secuencia de vector), se contempla adicionalmente que el péptido de la presente invención puede incluir una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga a una secuencia representada por SEQ ID NO: 34, en la que X en la posición 1 es M o está ausente, X en la posición 2 es G o está ausente, X en la posición 3 es S o está ausente, X en la posición 4 es S o está ausente, X en la posición 5 es H o está ausente, X en la posición 6 es H o está ausente, X en la posición 7 es H o está ausente, X en la posición 8 es H o está ausente, X en la posición 9 es H o está ausente, X en la posición 10 es H o está ausente, X en la posición 11 es S o está ausente, X en la posición 12 es S o está ausente, X en la posición 13 es G o está ausente, X en la posición 14 es L o está ausente, X en la posición 15 es V o está ausente, X en la posición 16 es P o está ausente, X en la posición 17 es R o está ausente, X en la posición 18 es G o está ausente, X en la posición 19 es S o está ausente, X en la posición 20 es H o está ausente, X en la posición 21 es M o está ausente, X en la posición 22 es A o está ausente, X en la posición 23 es S o está ausente, X en la posición 24 es M o está ausente, X en la posición 25 es T o está ausente, X en la posición 26 es G o está ausente, X en la posición 27 es G o está ausente, X en la posición 28 es Q o está ausente, X en la posición 29 es Q o está ausente, X en la posición 30 es M o está ausente, X en la posición 31 es G o está ausente, X en la posición 32 es R o está ausente, X en la posición 33 es G o está ausente, X en la posición 34 es S o está ausente, X en la posición 35 es E o está ausente, X en la posición 36 es F o está ausente, X en la posición 37 es E o está ausente, y X en la posición 38 es L o está ausente. Además, dado que la S en la posición 251 en la SEQ ID NO: 33 se sustituyó artificialmente durante el procedimiento de clonación descrito en la sección de ejemplos en el presente documento en esa secuencia (la proteína ASP5 de *Ancylostoma* de tipo natural incluye un residuo de C en esa posición), se contempla que X en la posición 251 de SEQ ID NO: 34 puede ser o bien S o bien C.

También se contempla que una cualquiera o más de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15,

SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 pueden ser sólo una porción de una secuencia de polipéptido más grande, y por tanto pueden representar una secuencia parcial de una o más proteínas que se expresan normalmente en gusano redondo, por ejemplo, o una o más secuencias de polipéptido que se fusionan artificialmente con SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 38, o Copro6728. El experto en la técnica reconocerá que existe una variedad de técnicas para fusionar artificialmente dos o más fragmentos de polipéptido entre sí.

Se contempla aún adicionalmente que el polipéptido de la presente invención puede incluir más de una de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede incluir las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Además, se contempla que el polipéptido de la presente invención puede incluir una pluralidad de fragmentos de polipéptido correspondientes a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede estar formado por una pluralidad de fragmentos de polipéptido correspondientes a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 28 que se fusionan entre sí. En otro ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede estar formado por una pluralidad de fragmentos de polipéptido correspondientes a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 28 y una pluralidad de fragmentos de polipéptido correspondientes a SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 30 que se fusionan entre sí en cualquier combinación.

Aunque se expresó un polipéptido particular de la presente invención y se aisló mediante una técnica específica (que se describe en la sección de ejemplos incluida en el presente documento), el experto en la técnica reconocerá que cualquiera de los polipéptidos de la presente invención puede aislarse empleando una cualquiera o más de una variedad de técnicas. (Véase, por ejemplo, Sewald y Jakubke, Peptides: Chemistry and Biology, Wiley Publishing (2002); Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology) Howl, ed., Humana Press (2005); Jones, Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press (2002). Estas técnicas incluyen las que pueden llevarse a cabo para aislar polipéptidos que existen de manera natural que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y cualquier variante que se produce de manera natural de esos polipéptidos. Estas técnicas incluyen además las que pueden llevarse a cabo para generar artificialmente los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y cualquier variante conservada de esos polipéptidos. Tales variantes pueden generarse, por ejemplo, empleando una cualquiera o más técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Los polipéptidos de la presente invención pueden provocar una respuesta inmunitaria en un animal huésped que se expone a estos polipéptidos para producir uno o más de los anticuerpos de la presente invención. Independientemente de la técnica mediante la cual se derivan, los polipéptidos de la presente invención se preparan preferiblemente en forma sustancialmente pura cuando van a usarse para el fin de obtener anticuerpos. Preferiblemente, estos polipéptidos son puros en al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente son puros en al menos aproximadamente el 90-95%, e incluso más preferiblemente son puros en al menos aproximadamente el 99%. En el presente documento se describen técnicas a modo de ejemplo para provocar una respuesta inmunitaria en un organismo huésped y para aislar anticuerpos del mismo, pero debe entenderse que la presente invención no se limita a esas técnicas. El experto en la técnica reconocerá que hay una pluralidad de técnicas para lograr el mismo objetivo sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención.

IV. Anticuerpos de la invención

La presente invención incluye además anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se obtienen contra, y que se unen específicamente a, la totalidad o parte de uno o más polipéptidos de la presente invención, y también incluye composiciones que incluyen dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cuando se ponen en contacto con una muestra obtenida de un mamífero, estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden unirse específicamente a un antígeno de gusano helmíntico particular. Como ejemplo adicional, los anticuerpos frente a gusano látigo y fragmentos de unión a antígeno pueden unirse específicamente a antígenos de gusano látigo presentes en la muestra, pero no pueden unirse específicamente a ningún antígeno de gusano de gancho o gusano redondo que puede estar presente en la muestra. Los anticuerpos de la presente invención son adecuados para usarse sólo para capturar uno o más antígenos de gusano látigo, sólo para detectar uno o más antígenos de gusano látigo, o más preferiblemente, tanto para capturar como para detectar uno o más antígenos de gusano látigo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden pertenecer a cualquier clase de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por el experto en la técnica. (Véase, por ejemplo, Dean, Methods Mol. Biol. 80:23-37 (1998); Dean, Methods Mol. Biol. 32:361-79 (1994); Baileg, Methods Mol. Biol. 32:381-88 (1994); Gullick, Methods Mol. Biol. 32:389-99 (1994);

Drenckhahn *et al.* 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); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, Howard y Kaser, eds., CRC Press (2006).

En una técnica, el polipéptido de la invención se introduce en un animal huésped, tal como en conejo, ratón, rata, cobaya, cabra, cerdo, vaca, oveja, burro, perro, gato, pollo o caballo, por ejemplo. Puede provocarse una respuesta inmunitaria potenciada en el animal huésped asociando el polipéptido con un portador y/o exponiendo el huésped a un adyuvante, pero debe entenderse que la presente invención no requiere que el polipéptido esté asociado con un portador ni que se exponga el huésped al adyuvante. Un portador a modo de ejemplo que puede usarse con este fin es albúmina sérica bovina, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de semilla de soja. Los adyuvantes a modo de ejemplo incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund y adyuvante MDL-TDM. Independientemente de si el polipéptido está asociado con un portador de este tipo o de si el huésped se expone a un adyuvante, opcionalmente pueden realizarse inmunizaciones de refuerzo extrayéndole posteriormente sangre al animal huésped una o más veces. Entonces pueden purificarse anticuerpos policlonales que se unen específicamente al polipéptido a partir de antisueros obtenidos de la extracción o las extracciones de sangre. Tal purificación puede lograrse, por ejemplo, empleando técnicas de cromatografía de afinidad que implican asociar el polipéptido a un soporte sólido. El experto en la técnica conoce muy bien tales técnicas de cromatografía de afinidad.

En varias realizaciones, el anticuerpo frente a gusano redondo de la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 21, (a continuación en el presente documento, estos anticuerpos particulares se denominan anticuerpos “anti-DIV6744”, “anti-DIV6716” y “anti-DIV6728” respectivamente). El experto en la técnica reconocerá que la producción y el aislamiento de anticuerpos de anti-DIV6744, anti-DIV6716 y anti-DIV6728, o cualquier otro anticuerpo de la presente invención, no se limitan a ninguna técnica específica.

En otra realización, el anticuerpo frente a gusano redondo de la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a 6728C (SEQ ID NO: 38). (A continuación en el presente documento, este anticuerpo particular se denomina anticuerpo “anti-Copro6728C”). En la sección de ejemplos en el presente documento se describe una técnica específica para producir y aislar este anticuerpo, pero el experto en la técnica reconocerá que la producción y el aislamiento de anticuerpo anti-Copro6728C no se limitan a esta técnica específica.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo frente a gusano redondo de la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con extracto de gusano redondo completo, extracto de intestino de gusano redondo, o extracto de órganos reproductores de gusano redondo, tal como se describe en la solicitud estadounidense con n.º de serie 11/763.592 titulada “Roundworm Coproantigen Detection”, presentada el 15/6/2007.

En una realización adicional, el anticuerpo frente a gusano látigo de la presente invención es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 (a continuación en el presente documento, este anticuerpo particular se denomina anticuerpo “anti-DIV6901” o “anti-DIV6902”). El experto en la técnica reconocerá que la producción y el aislamiento de anticuerpo anti-DIV6901, anti-DIV6901 o cualquier otro anticuerpo de la presente invención, no se limitan a ninguna técnica específica.

En otra realización, un anticuerpo frente a gusano de gancho de la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 34. (A continuación en el presente documento, este anticuerpo particular se denomina anticuerpo “anti-Asp5-1”). El experto en la técnica reconocerá que la producción y el aislamiento de anticuerpo anti-Asp5-1, o cualquier otro anticuerpo de la presente invención, no se limitan a ninguna técnica específica.

En una realización adicional, el anticuerpo frente a gusano de gancho de la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se obtiene en conejo inmunizando ese animal huésped con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 33, es decir sustancialmente con la proteína ASP5 de longitud completa de gusano de gancho, tal como se describe en la solicitud estadounidense con n.º de serie 11/763.583 titulada “Device, Kit and Method for Hookworm Antigen Detection”, presentada el 15/6/2007.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se obtienen en un huésped contra uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es una variante conservativa de la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 5. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se obtienen en un huésped contra uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, o uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es una variante conservativa de cualquiera de esas secuencias.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos que se unen específicamente a uno o más de los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, o porciones antigénicas de los mismos.

En aún otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es una variante conservativa de la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 5. En algunas otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, o uno o más polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es una variante conservativa de cualquiera de esas secuencias.

También se entiende que los anticuerpos de la invención pueden ser opcionalmente anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, y fragmentos de los mismos. Pueden obtenerse y purificarse anticuerpos monoclonales que son específicos para el polipéptido de interés, por ejemplo, preparando líneas celulares que generan anticuerpos que tienen la especificidad deseada frente al polipéptido de interés. Pueden derivarse líneas celulares de esta clase a partir de células de un tipo particular (por ejemplo, células del bazo) que se aíslan de un animal huésped que se había inmunizado previamente con el polipéptido tal como se describió anteriormente. En tal caso, entonces pueden inmortalizarse estas células, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma llevando a cabo una cualquiera de una variedad de técnicas de fusión conocidas por el experto en la técnica. En una técnica a modo de ejemplo, se incuban conjuntamente las células del animal huésped inmunizado con su pareja de fusión, por ejemplo, las células de mieloma, en presencia de un detergente durante un periodo de tiempo corto antes de sembrarse en placas en un medio que soporta el crecimiento de células híbridas (pero no la pareja de fusión de mieloma). Tal selección puede lograrse, por ejemplo, usando hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cuando surgen células híbridas durante la selección, quizás en una o dos semanas tras comenzar el procedimiento de selección, se someten a prueba colonias híbridas individuales (y sus sobrenadantes) para determinar su capacidad para unirse al polipéptido o a los polipéptidos contra los que se inmunizó el animal huésped. Las colonias híbridas que tienen la especificidad de unión más óptima representarán los mejores candidatos a partir de los cuales pueden aislarse anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, estos anticuerpos monoclonales pueden aislarse directamente del sobrenadante (es decir, el medio) en el que se hacen crecer estas colonias empleando una cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Los anticuerpos de la invención también pueden ser 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 una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión a antígeno o la región variable de un anticuerpo intacto, en los que la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ y Fv. Además de la producción y purificación a partir de animales o células de mamífero, pueden seleccionarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o estructuras distintas de anticuerpos basándose en diversas tecnologías *in vitro*, incluyendo presentación en fagos, presentación ribosómica o presentación bacteriana.

Los anticuerpos, incluyendo anticuerpos secundarios, pueden marcarse con cualquier tipo de marcador conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimas, partículas coloidales, radioisótopos y marcadores bioluminiscentes. En diversas realizaciones de la invención, el uno o más de los anticuerpos de la invención se marcan con una enzima, una partícula coloidal, un radionúclido o un fluoróforo. El marcador particulado puede ser, por ejemplo, una partícula de látex coloreada, sol de colorante o sol de oro conjugada con un anticuerpo.

Métodos, dispositivos y kits de la invención

Dispositivos y kits de la invención

La presente invención, en un aspecto, es una detección de la presencia o ausencia de uno o más antígenos helmínticos de una muestra, comprendiendo el dispositivo un soporte sólido tal como se define en las reivindicaciones. El dispositivo está dispuesto para ayudar a unir específicamente y aislar coproantígenos helmínticos de gusano látigo en una muestra de un mamífero.

En un aspecto, el dispositivo incluye un soporte sólido, en el que uno o más anticuerpos de la invención están inmovilizados sobre el soporte sólido. El soporte sólido puede ser, pero no se limita a ser, la superficie interior, inferior, de un pocillo de una placa de microtitulación o un sustrato que se incluye como parte de un dispositivo de flujo lateral, por ejemplo. Una placa de microtitulación a modo de ejemplo es una placa de 96 pocillos Immulon 1B (que está disponible comercialmente de Thermo Scientific de Milford, MA), pero debe entenderse que el experto en la técnica reconocerá que una gran variedad de otras placas de microtitulación que no son la placa de 96 pocillos Immulon 1B permiten la inmovilización de anticuerpos sobre las mismas, y por tanto serán adecuadas para proporcionar el soporte sólido de la presente invención.

Un dispositivo de flujo lateral a modo de ejemplo es el dispositivo de flujo lateral que se describe en la patente estadounidense n.º 5.726.010. El dispositivo para realizar un ensayo de flujo lateral puede ser un dispositivo SNAP®, que está disponible comercialmente de IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME. Sin embargo, debe entenderse que el experto en la técnica reconocerá que una gran variedad de otros dispositivos de flujo lateral que no son dispositivos SNAP® ni se describen en la patente estadounidense n.º 5.726.010 permiten la inmovilización de un anticuerpo sobre los mismos, y por tanto serán adecuados para usarse como dispositivo de la presente invención. Estos dispositivos pueden incluir, por ejemplo, dispositivos de flujo lateral que usan tecnología de oro coloidal.

Los anticuerpos usados en el dispositivo de la invención pueden inmovilizarse sobre el soporte sólido mediante cualquier metodología conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, fijar de manera covalente o no covalente, directa o indirectamente, los anticuerpos al soporte sólido. Por tanto, aunque estos anticuerpos pueden fijarse al soporte sólido mediante adsorción física (es decir, sin usar grupos de unión químicos), también es cierto que estos anticuerpos pueden inmovilizarse al soporte sólido mediante cualquier método de unión química (es decir, con el uso de grupos de unión químicos) fácilmente conocido por un experto en la técnica.

También debe entenderse que el soporte sólido puede ser cualquier material adecuado para la inmovilización de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser perlas, partículas, tubos, pocillos, sondas, tiras reactivas, puntas de pipeta, portaobjetos, fibras, membranas, papeles, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, vidrio, polipropileno, polietileno, poliestireno, dextrano, nailon, amilasas, plásticos, magnetita o cualquier otro material adecuado fácilmente conocido por un experto en la técnica.

El dispositivo puede incluir opcionalmente uno o más reactivos de captura de antígeno marcados que pueden mezclarse con una muestra de un mamífero antes de la aplicación a un dispositivo de la invención. Cuando se incluye el reactivo de captura de antígeno marcado, el reactivo de captura de antígeno marcado puede depositarse o secarse, o no, sobre una superficie sólida del dispositivo. “Reactivo de captura de antígeno” se refiere a cualquier compuesto que es específico para el antígeno o los antígenos de interés. El reactivo de captura de antígeno marcado, tanto si se añade a la muestra de mamífero como si se deposita previamente sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado, incluyendo los anticuerpos de la presente invención. En un ejemplo, puede usarse anticuerpo anti-DIV6744 conjugado con peroxidasa del rábano como reactivo de captura de antígeno marcado. En otro ejemplo, puede usarse anticuerpo anti-DIV6901 o anti-DIV6902 conjugado con peroxidasa del rábano como reactivo de captura de antígeno marcado. En un ejemplo adicional, puede usarse anticuerpo anti-DIV6716 conjugado con peroxidasa del rábano como reactivo de captura de antígeno marcado. En un ejemplo adicional, puede usarse anticuerpo anti-DIV6728 conjugado con peroxidasa del rábano como reactivo de captura de antígeno marcado. En aún un ejemplo adicional, puede usarse anticuerpo anti-Copro6728 conjugado con peroxidasa del rábano como reactivo de captura de antígeno marcado.

El dispositivo también puede incluir opcionalmente un reactivo líquido que transporta (tal como cuando el dispositivo es un dispositivo SNAP®, por ejemplo), o facilita de otro modo la retirada de (tal como cuando el dispositivo incluye una placa de microtitulación, por ejemplo) material no unido (por ejemplo, porciones sin reaccionar de la muestra de mamífero, tales como, por ejemplo, porciones sin reaccionar de extracto fecal, y reactivo de captura de antígeno no unido) alejándolo de la zona de reacción (fase sólida). El reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y servir sólo para retirar material no unido de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir tanto para retirar material no unido como para facilitar la detección de antígeno. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de captura de antígeno conjugado con una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el conjugado enzima-anticuerpo en la zona de reacción (fase sólida). Alternativamente, en el caso de un reactivo de captura de antígeno marcado conjugado con una molécula radiactiva, fluorescente o de absorción de luz, el reactivo líquido actúa simplemente como disolución de lavado facilitando la detección de formación de complejo en la zona reactiva eliminando mediante lavado reactivo marcado no unido.

El reactivo líquido puede incluir además una cantidad limitada de un “inhibidor”, es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Se define una cantidad limitada como que es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo de producto final hasta que la mayor parte o la totalidad del material no unido en exceso se transporta alejándolo de la segunda región, momento en el cual se produce producto final detectable.

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

Además de diseñarse para unirse específicamente y aislar coproantígenos helmínticos de gusano látigo en una muestra de mamífero, el dispositivo de la invención puede diseñarse opcionalmente para permitir realizar una o más otras pruebas de diagnóstico. Por ejemplo, el soporte sólido también puede incluir reactivos para la detección de uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos o una o más bacterias. Los reactivos para la detección de uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos o una o más bacterias pueden ser, por ejemplo, uno o más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos o una o más bacterias.

En una realización, el dispositivo de la presente invención es una placa de microtitulación que incluye una pluralidad de pocillos, en la que cada pocillo incluye un soporte sólido que tiene Acp anti-DIV6744 inmovilizado sobre el mismo.

La placa puede usarse junto con un método de la presente invención para detectar la presencia o ausencia de uno o más coproantígenos helmínticos en una muestra. Por ejemplo, puede diagnosticarse una infección por gusano redondo en un mamífero detectando uno o más antígenos de gusano redondo con el Acp anti-DIV6744, uno o más antígenos de gusano látigo con el Acp anti-DIV6902, y uno o más antígenos de gusano de gancho con el Acp anti-Asp5-1, que se inmovilizan sobre el soporte sólido. En una realización, los antígenos que se detectan son coproantígenos. “Coproantígenos” son cualquier producto de gusano redondo, gusano látigo o gusano de gancho que está presente en una muestra fecal y que puede unirse específicamente a anticuerpos. Por tanto, coproantígenos pueden ser gusano completo, huevos de gusano, fragmentos de gusano o producto secretados, excretados o expulsados mediante muda de gusano o una combinación de los mismos. Los coproantígenos incluyen además los polipéptidos de la presente invención, tales como los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es una variante conservativa de esas secuencias, y/o fragmentos antigénicos de cualquiera de tales polipéptidos, y CoproASP5 y Copro6728, por ejemplo.

La invención incluye además kits de ensayo (por ejemplo, artículos de fabricación) para detectar y distinguir entre gusano redondo, gusano látigo y/o gusano de gancho en una muestra de mamífero. Por tanto, un kit puede incluir uno o más dispositivos y/o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, el kit incluye anticuerpos anti-gusano látigo y medios para determinar la unión de los anticuerpos a antígenos de gusano látigo en la muestra. En un ejemplo particular, tal kit incluye el dispositivo que tiene inmovilizado un anticuerpo anti-gusano látigo, tal como anticuerpo anti-DIV6902, por ejemplo, uno o más reactivos de captura de antígeno (por ejemplo, un reactivo de captura de antígeno marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de antígeno inmovilizado) y reactivo de lavado, así como reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. En tales kits de prueba pueden incluirse otros componentes tales como tampones, controles y similares, conocidos por los expertos habituales en la técnica. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para combinarse con una muestra. El presente kit puede incluir además instrucciones para llevar a cabo uno o más métodos de la presente invención, incluyendo instrucciones para usar cualquier dispositivo y/o composición de la presente invención que se incluye con el kit.

B. Métodos de la invención

La presente invención incluye además métodos para usar uno o más de los dispositivos, kits y/o composiciones de la presente invención para detectar la presencia o ausencia de uno o más antígenos helmínticos en una muestra. Por tanto, los métodos pueden llevarse a cabo para detectar la presencia o ausencia de gusano látigo en una muestra, tal como, por ejemplo, una muestra fecal, que se obtiene de un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, un animal canino, animal felino, animal porcino, animal bovino o ser humano. Además, los métodos pueden llevarse a cabo para detectar *Trichuris* y/o *Trichocephalus,* tal como *Trichuris vulpis, Trichuris campanula, Trichuris serrata, Trichuris suis, Trichuris trichiura, Trichuris discolor* y *Trichocephalus trichiuris,* por ejemplo.

En los métodos de la presente invención, la detección de gusano látigo puede realizarse detectando la presencia o ausencia de uno o más antígenos de gusano látigo, tales como Copro6728 y CoproASP5 o los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, así como fragmentos antigénicos y/o variantes conservativas de esas secuencias, y CoproASP5, por ejemplo. Cuando la muestra sometida a prueba para detectar coproantígenos helmínticos son heces, la porción soluble de las heces puede recogerse mediante cualquier protocolo conocido en la técnica. Por ejemplo, además del protocolo específico descrito en la sección de ejemplos en el presente documento, las porciones solubles de la muestra generalmente pueden recogerse usando filtración, extracción, centrifugación, o simple mezclado seguido por sedimentación gravimétrica. El experto en la técnica reconocerá que también existe una variedad de formas de extraer y preparar muestras no fecales de un mamífero. Por ejemplo, la muestra puede ser un fluido corporal que se excreta de manera natural o se libera de otro modo por el mamífero o que se obtiene artificialmente del mamífero. Puede llevarse a cabo una extracción artificial de este tipo ordeñando el mamífero o inyectando una jeringuilla en el mamífero y extrayendo el fluido al interior de la jeringuilla. Una vez obtenido, el fluido puede fraccionarse opcionalmente (por ejemplo, puede fraccionarse suero a partir de sangre completa que luego se

usa como muestra). Como otro ejemplo, la muestra puede obtenerse realizando un frotis en el mamífero, tal como en la cavidad bucal del mamífero, por ejemplo. Aún como otro ejemplo, pueden obtenerse secciones de tejido mediante biopsia.

Los métodos incluyen poner en contacto la muestra de mamífero con uno o más anticuerpos específicos para coproantígenos helmínticos en condiciones que permiten que se forme un complejo antígeno/anticuerpo, es decir, un inmunocomplejo. Es decir, un anticuerpo se une específicamente a un coproantígeno presente en la muestra. El experto en la técnica está familiarizado con ensayos y condiciones que pueden usarse detectar tal unión de complejo antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, el complejo antígeno/anticuerpo puede detectarse usando un anticuerpo secundario que se une al complejo antígeno/anticuerpo. La formación de un complejo entre el antígeno y anticuerpos en la muestra puede detectarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Además, puede medirse la cantidad relativa de complejos anticuerpo-antígeno que se forman en una reacción particular con respecto a los formados en cualquier otra reacción mediante cualquier metodología conocida en la técnica para lograr ese objetivo. Cuando se determina que una muestra sometida a prueba tiene complejos anticuerpo-antígeno específicos (gusano látigo), puede concluirse, basándose en los complejos específicos formados, que está presente un helminto específico en el mamífero huésped y qué helminto está presente (gusano látigo). Cuando esto es cierto, puede concluirse que el mamífero a partir del cual se obtuvo la muestra de prueba alberga una infección por helmintos intestinales. Las conclusiones de que el mamífero que está sometiéndose a prueba alberga una infección por helmintos intestinales puede realizarlas un médico en un proveedor de servicios de diagnóstico o un cuidador del mamífero, tal como el veterinario del mamífero, por ejemplo. Cuando un cuidador de un mamífero determina (o se le informa de otro modo de que) un mamífero alberga una infección por helmintos y qué helminto está presente, el cuidador puede someter entonces al mamífero a un ciclo de tratamiento que está diseñado de manera óptima para librar al mamífero del helminto específicamente, más que de una infección por nematodos parásitos en general. Además, la presente invención puede usarse para confirmar que cualquier animal que ha recibido tratamiento para la infección por helminto específico se ha librado de tal infección. Un cuidador que sabe que una muestra incluye tanto gusano redondo como gusano látigo, pero no gusano de gancho, por ejemplo, puede usar este conocimiento para tratar al mamífero del que se tomó la muestra específicamente para gusano redondo administrando a ese mamífero un fármaco eficaz de manera óptima contra gusano redondo y un segundo fármaco eficaz de manera óptima contra gusano látigo. Si carece de tal conocimiento, el cuidador puede tratar, por ejemplo, de otro modo al mamífero con un fármaco que es eficaz de manera óptima sólo contra gusano redondo, sólo contra gusano látigo, o ni contra gusano redondo ni contra gusano látigo (en tales casos, el mamífero correría el riesgo de recibir un tratamiento subóptimo). Además, puede aconsejarse a los seres humanos que pueden ponerse en contacto con el animal infestado o sus excreciones que tomen precauciones frente a adquirir el parásito o los parásitos. En este contexto, es importante determinar la especie de gusano con alta especificidad, ya que algunos helmintos, tales como gusanos redondos y gusanos de gancho, pueden producir enfermedad significativa (por ejemplo, larva migratoria) en seres humanos, mientras que generalmente se acepta que el gusano látigo no desempeña un papel zoonótico de importancia en seres humanos.

Las etapas del método de la presente invención pueden incluir aplicar una muestra de mamífero a un dispositivo de la invención. Los anticuerpos específicos para antígenos de gusanos redondos pueden fijarse directa o indirectamente a un sustrato o soporte sólido tal como un pocillo de microtitulación, parte de inmovilización de anticuerpo de un dispositivo SNAP®, perla magnética, perla no magnética, columna, matriz, membrana, estera fibrosa compuesta por fibras naturales o sintéticas (por ejemplo, materiales basados en vidrio o celulosa o polímeros termoplásticos, tales como polietileno, polipropileno o poliéster), estructura sinterizada compuesta de materiales particulados (por ejemplo, vidrio o diversos polímeros termoplásticos), o película de membrana fundida compuesta por nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similar (generalmente de naturaleza sintética). Todos estos materiales de sustrato pueden usarse en conformaciones adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden recubrirse sobre o unirse o laminarse a portadores inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico o tejidos. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes.

Sin embargo, los métodos de la presente invención no requieren usar los sustratos o las fases sólidas. El experto en la técnica reconocerá que hay varias formas en que puede llevarse a cabo el presente método para detectar la presencia o ausencia de gusano redondo sin implicar el uso de sustratos o fases sólidas. Sólo en un ejemplo, pueden llevarse a cabo métodos de inmunoprecipitación que no requieren el uso de sustratos o fases sólidas.

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

La formación de un complejo antígeno/anticuerpo o complejo antígeno/anticuerpo/indicador en algunos de los métodos de la presente invención puede detectarse específicamente mediante métodos radiométricos,

colorimétricos, fluorimétricos, fotométricos, de separación por tamaño o de precipitación. La detección de un complejo antígeno/anticuerpo también puede realizarse mediante la adición de un anticuerpo secundario que se acopla a un reactivo indicador que incluye un compuesto de generación de señales. Los reactivos indicadores que incluyen compuestos de generación de señales (marcadores) asociados con un complejo polipéptido/anticuerpo pueden detectarse usando los métodos descritos anteriormente y pueden incluir agentes cromogénicos, catalizadores tales como conjugados enzimáticos, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcadores visuales directos, así como cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Los ejemplos de conjugados enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, beta-galactosidasa y similares. La selección de un marcador particular no es crítica, pero podrá producir una señal o bien por sí mismo o bien conjuntamente con una o más sustancias adicionales.

Los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los basados en competencia, reacción directa o ensayos de tipo sándwich, incluyendo, pero sin limitarse a ELISA, RIA, ensayos inmunofluorescentes (IFA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo por polarización de fluorescencia (FPIA) y ensayos en placa de microtitulación (es decir, cualquier ensayo realizado en uno o más pocillos de una placa de microtitulación). Un ensayo de la invención incluye un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, que puede realizarse, por ejemplo, usando un dispositivo SNAP®. Véase la patente estadounidense n.º 5.726.010.

En algunas realizaciones, el método de la invención facilita ensayos de unión específica de tipo sándwich o competencia. En un ensayo de tipo sándwich, se inmovilizan reactivos de captura de antígeno en una zona reactiva. Estos reactivos de captura de antígeno pueden unirse específicamente a antígenos en la muestra que está sometiéndose a prueba para detectar gusano redondo, gusano látigo y/o gusano de gancho. Tras la unión del antígeno de la muestra, se detecta el complejo reactivo de captura de antígeno/antígeno mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, el complejo puede hacerse reaccionar con reactivos de unión específica marcados (por ejemplo, un conjugado enzima-anticuerpo) y puede detectarse el antígeno (por ejemplo, tras la reacción con un sustrato).

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

En algunas realizaciones del método, se fijan anticuerpos específicos para coproantígenos de un gusano látigo a un sustrato o fase sólida. Se añade al sustrato una muestra que incluye posiblemente un antígeno de gusano látigo. Se añaden anticuerpos que se unen específicamente a gusano látigo. Los anticuerpos pueden ser los mismos anticuerpos usados en la fase sólida o pueden proceder de una fuente o especie diferente. Además, estos anticuerpos pueden unirse a un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Pueden llevarse a cabo etapas de lavado antes de cada adición. Puede añadirse un cromóforo o sustrato enzimático y puede permitirse que se desarrolle color. Puede detenerse la reacción de color y puede cuantificarse el color usando, por ejemplo, un espectrofotómetro y/o puede evaluarse subjetivamente el color por el ojo humano.

En otras realizaciones del método, se fijan anticuerpos específicos para coproantígenos de gusano látigo a un sustrato o fase sólida. Se añade al sustrato una muestra que incluye posiblemente un antígeno de gusano látigo. Se añaden segundos anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a los coproantígenos. Estos segundos anticuerpos proceden de una especie diferente que los anticuerpos en 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 incluir un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Pueden llevarse a cabo etapas de lavado antes de cada adición. Puede añadirse un cromóforo o sustrato enzimático y puede permitirse que se desarrolle color. Puede detenerse la reacción de color y puede cuantificarse el color usando, por ejemplo, un espectrofotómetro y/o puede evaluarse subjetivamente el color por el ojo humano.

En un ejemplo específico, el método de la presente invención se lleva a cabo conjuntamente con un dispositivo que es un dispositivo de ensayo de flujo lateral añadiendo una muestra de mamífero preparada a una matriz de flujo del dispositivo en una primera región (una zona de aplicación de muestra). La muestra preparada se porta en una trayectoria de flujo de fluido mediante acción capilar hacia una segunda región de la matriz de flujo en la que existe un marcador particulado que puede unirse a, y formar un primer complejo con, un antígeno en la muestra. El marcador particulado puede ser, por ejemplo, una partícula de látex coloreada, sol de colorante o sol de oro conjugado con un anticuerpo específico para un antígeno de gusano redondo. El primer complejo se porta a una tercera región de la matriz de flujo en la que se inmoviliza un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de gusano redondo en una ubicación distinta. Se forma un segundo complejo entre el anticuerpo inmovilizado y el primer complejo. El marcador particulado que forma parte del segundo complejo puede visualizarse directamente por el ojo humano.

Cada anticuerpo frente a helminto específico puede ser un reactivo de captura de antígeno inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de antígeno, es decir, un segundo anticuerpo frente a helminto específico que se ha conjugado con un marcador, o bien puede añadirse a la muestra antes de que la muestra se añada al dispositivo, o bien el segundo reactivo de captura de antígeno puede incorporarse en el dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de captura de antígeno marcado puede depositarse y secarse en una trayectoria de flujo de fluido que proporciona comunicación de fluido entre una zona de aplicación de muestra y la fase sólida. El contacto del reactivo de captura de antígeno marcado con la muestra de prueba puede dar como resultado la disolución del reactivo de captura de antígeno marcado.

En una realización del método de la presente invención, se detecta coproantígeno helmíntico específico mediante ELISA. En la sección de ejemplos incluida en el presente documento se describen ejemplos específicos del método de ELISA de la presente invención. Aunque la presente invención se describe con respecto a estos métodos de ELISA específicos, sin embargo, ha de entenderse que los expertos habituales en la técnica reconocerán que pueden usarse etapas de ELISA alternativas, adicionales o sustitutas sin desviarse del objetivo básico logrado mediante este método de la invención.

En otra realización de la presente invención, el coproantígeno helmíntico se detecta usando un dispositivo de flujo lateral, tal como un dispositivo SNAP®, por ejemplo.

Además, los métodos de la invención para la detección de infección por helmintos pueden combinarse con otros ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de otros organismos o estados. Por ejemplo, los ensayos de la invención pueden combinarse con reactivos que detectan uno o más parásitos fecales distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos, una o más bacterias, uno o más parásitos portados por la sangre o sangre oculta o una combinación de los mismos. Al proporcionar dos o más sitios de unión únicos en un único dispositivo de ensayo (tal como, por ejemplo, dos puntos únicos en un dispositivo de ensayo SNAP®), la presente invención permite la detección de dos o más organismos a partir de una única muestra. En una realización, hay tres puntos únicos para la detección de infección o infestación pasada o presente procedentes de tres organismos (siendo los puntos los reactivos de unión o bien a antígeno o bien a anticuerpo) a partir de una única muestra (es decir, la misma muestra individual se expone a tres reactivos de captura en un único dispositivo). Aún en otra realización, hay cuatro puntos únicos para la detección de infección o infestación pasada o presente procedentes de cuatro organismos (siendo los puntos los reactivos de unión o bien a antígeno o bien a anticuerpo) a partir de una única muestra (es decir, la misma muestra individual se expone a los cuatro reactivos de captura en un único dispositivo). Sin embargo, ha de entenderse que el mismo dispositivo puede incluir más de cuatro puntos únicos y/o permitir la detección de más de cuatro organismos.

Los reactivos para la detección de uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos o una o más bacterias pueden ser, por ejemplo, uno o más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos o una o más bacterias.

Además, el método puede incluir opcionalmente el uso de uno o más ácidos nucleicos de gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho, incluyendo, pero sin limitarse a, los ácidos nucleicos de la presente invención, para determinar la presencia o ausencia de gusano látigo en una muestra de mamífero. Tal uso de estos ácidos nucleicos para determinar la presencia del helminto puede llevarse a cabo antes, después o simultáneamente con llevar a cabo cualquiera de los otros aspectos del método, incluyendo la detección de gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho mediante anticuerpos. Por tanto, en un aspecto, una vez detectado o no detectado un gusano látigo en una muestra particular y diagnosticado el mamífero del que se obtuvo la muestra como que tiene o no tiene una infección por gusano látigo, la muestra (o una muestra obtenida más tarde del mamífero diagnosticado) puede someterse a prueba para determinar la presencia o ausencia de uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos, incluyendo uno cualquiera o más ácidos nucleicos de la invención. Cualquiera que no logre detectar un helminto específico en un mamífero particular mediante el uso de uno o más ácidos nucleicos (una vez que se ha detectado el helminto mediante el uso de uno o más anticuerpos) necesitará tener en cuenta la posibilidad de que los anticuerpos hayan detectado coproantígeno helmíntico antes de la aparición del ácido nucleico helmíntico detectable en la muestra. En tal caso, el cuidador del mamífero puede elegir ignorar la observación de que el ácido nucleico no haya logrado detectar el helminto y continuar tratando al mamífero específicamente para la infección por helmintos basándose en la observación de que los anticuerpos habían detectado de hecho el helminto. En otro aspecto, los ácidos nucleicos se usan para determinar la presencia o ausencia de helmintos en un mamífero particular, y entonces se evalúa adicionalmente la presencia o ausencia de helmintos usando los anticuerpos de la presente invención. La detección de uno o más ácidos nucleicos helmínticos pueden llevarse a cabo usando cualquier técnica de detección de ácidos nucleicos conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, tal detección pueden llevarse a cabo realizando una técnica basada en PCR, tal como, pero sin limitarse a, por ejemplo, una técnica basada en PCR en tiempo real. Técnicas basadas en PCR a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en PCR Protocols (Methods in Molecular Biology), 2ª ed., Bartlett and Stirling, eds., Humana Press (2003); y Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

La presente invención se describe específicamente con referencia a cinco ejemplos; sin embargo, no debe

interpretarse como que se limita a los mismos.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, se usaron los siguientes materiales y técnicas para generara datos descritos en uno o más de los ejemplos 1-4 tal como se describen a continuación.

Preparación de anticuerpo policlonal frente a gusano redondo. Se obtuvieron los anticuerpos policlonales “Acp anti-DIV6728”, (IgG) en conejo contra un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 21, respectivamente y se purificaron a partir de suero usando métodos convencionales. En resumen, para Acp anti-DIV6728 se clonaron los nucleótidos 76 a 456 de SEQ ID NO: 17 dentro del marco en un vector (D8223, que es un derivado de pUC19) para crear el plásmido D8245. Específicamente, los 125 aminoácidos de SEQ ID NO: 21 que siguen al residuo de metionina en el extremo N-terminal de esa secuencia corresponden a una porción de SEQ ID NO: 19 y se codifican por la porción clonada de SEQ ID NO: 17. En el plásmido D8245, el residuo de metionina N-terminal se codifica por la secuencia de vector en la unión de ese plásmido en el que el vector estaba ligado a la secuencia clonada de SEQ ID NO: 17.

Entonces se escindió la secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 21 del plásmido D8245 mediante digestión por exonucleasas de restricción (NdeI y BamHI) y se purificó. Entonces se ligó esta secuencia purificada con el vector de expresión linealizado, pET28a, y se transformó el constructo circular resultante (pTDX198::DIV6728) en el interior de células de *E. coli* BL21 (DE3). (Se confirmó la secuencia completa del inserto mediante análisis de la secuencia de ADN). Se indujo la expresión de proteína de fusión con etiqueta de His mediante la adición de IPTG 1 mM a los cultivos de *E. coli* transformada. Se solubilizó la proteína recombinante en urea 6 M y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y afinidad por níquel. (Esta proteína recombinante se denomina a continuación en el presente documento “rDIV6728”).

Tras introducir rDIV6728 en conejos, se purificó Acp anti-DIV6728 a partir del plasma de los conejos inmunizados aislando el anticuerpo IgG mediante cromatografía de afinidad por proteína G.

Preparación de anticuerpo policlonal frente a gusano látigo. Se obtuvo el anticuerpo policlonal “Acp anti-DIV6901” (IgG) en conejo contra un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 5 y se purificó a partir de suero usando métodos convencionales. En resumen, en el caso de Acp anti-DIV6901, se clonaron los nucleótidos 89 a 1147 de SEQ ID NO: 1 dentro del marco en un vector de expresión (D8223, que es un derivado de pUC 19) para crear el plásmido D9073. Específicamente, los 353 aminoácidos de SEQ ID NO: 5 que siguen al residuo de metionina en el extremo N-terminal de esa secuencia corresponden a una porción de SEQ ID NO: 3 y se codifican por la porción clonada de SEQ ID NO: 1.

Entonces se escindió la secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 5 a partir del plásmido D9073 mediante digestión por exonucleasas de restricción (NdeI y BamHI) y se purificó. Entonces se ligó esta secuencia purificada con el vector de expresión linealizado, pET28a, y se transformó el constructo circular resultante (ptDX233::DIV6901) en el interior de células *E. coli.* (Se confirmó la secuencia completa del inserto mediante análisis de la secuencia de ADN). Se indujo la expresión de proteína de fusión con etiqueta de His mediante la adición de IPTG 1 mM a los cultivos de *E. coli* transformada. Se solubilizó la proteína recombinante en urea 6 M y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y afinidad por níquel. (Esta proteína recombinante se denomina a continuación en el presente documento “rDIV6901”). Se purificó Acp anti-DIV6901 a partir del plasma de los conejos inmunizados aislando el anticuerpo IgG mediante cromatografía de afinidad por proteína G.

Preparación y aislamiento del anticuerpo policlonal frente a gusano de gancho. Se obtuvo el anticuerpo policlonal anti-ASP5-1 (IgG) en conejo contra un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 34 y se purificó a partir de suero usando métodos convencionales. En resumen, se clonaron los nucleótidos 50 a 427 de SEQ ID NO: 32 dentro del marco en un plásmido. Específicamente, los 129 aminoácidos de SEQ ID NO: 34 que siguen al residuo de metionina en el extremo N-terminal de esa secuencia corresponden a una porción de SEQ ID NO: 33 y se codifican por la porción clonada de SEQ ID NO: 32. En el plásmido, se codificó el residuo de metionina N-terminal por la secuencia de vector en la unión de ese plásmido en el que el vector estaba ligado a la secuencia clonada de SEQ ID NO: 32.

Entonces se escindió la secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 32 a partir del plásmido mediante digestión por exonucleasas de restricción (NotI y SacI) y se purificó. Entonces se ligó esta secuencia purificada con el vector de expresión linealizado, pET28a, y se transformó el constructo circular resultante en el interior de células de *E. coli* BL21 (DE3). (Se confirmó la secuencia completa del inserto mediante análisis de la secuencia de ADN). Se indujo la expresión de proteína de fusión con etiqueta de His mediante la adición de IPTG 1 mM a los cultivos de *E. coli* transformada. Se solubilizó la proteína recombinante en urea 6 M y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y afinidad por níquel. (Esta proteína recombinante se denomina a continuación en el presente documento “rASP5-1”).

Tras introducirse rASP5-1 en conejos, se purificó Acp anti-ASP5-1 a partir del plasma de los conejos inmunizados

aislando el anticuerpo IgG mediante cromatografía de afinidad por proteína G.

Infección de animales caninos y felinos. Se efectuó la infección por nematodos parásitos administrando por vía oral aproximadamente 150-300 huevos en estado larvario de gusano redondo (*Toxocara canis*), 150-300 larvas infectivas de gusano de gancho (*Ancylostoma caninum*), o 700 huevos en estado larvario de gusano látigo (*Trichuris vulpis*), o cualquier combinación de los tres a un animal canino o felino sano. Se confirmó la infección mediante la observación microscópica de huevos de gusano en muestras fecales obtenidas de estos animales huésped.

Preparación de muestra fecal de animales caninos y felinos. Animales caninos y felinos animales que se sabía que estaban libres de infección por gusanos parásitos o que tenían infección por uno, dos o los tres de gusano redondo, gusano de gancho o gusano látigo proporcionaron la fuente de muestras fecales. Se suspendieron muestras (aproximadamente 1 gramo) a partir de muestras fecales de animales caninos o felinos congeladas, sin conservantes, en 4 ml de disolución de diluyente (la "disolución de diluyente" es base Tris 0,05 M; EDTA 1 mM; Kathon al 0,45%; sulfato de gentamicina 16 mg/l; Tween-20 al 0,05%; suero bovino fetal al 40%; suero de conejo al 10%; y suero de ratón al 5%). Se centrifugó la suspensión en una centrífuga de sobremesa a 4000 rpm durante 20 minutos para producir un primer sobrenadante. Se centrifugó el primer sobrenadante a 10.000 g durante 5 minutos para producir un segundo sobrenadante, que se denomina en el presente documento "extracto fecal".

Ensayos de ELISA. Se inmovilizaron Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp5-1 purificados (100 μl/pocillo; 3 μg/ml para el ejemplo 2) mediante adsorción física sobre placas de 96 pocillos Immulon 1B durante la noche a 4ºC. Entonces se bloquearon las placas con BSA al 1% en Tris 0,1 M, pH 7,0 o durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido por sacarosa al 2,5% en tampón Tris 0,1 M, pH 7,0 durante 3 horas a temperatura ambiente, aspirando el líquido, secando a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 100 μl de extracto fecal a cada pocillo y se permitió que se incubaran a temperatura ambiente durante una hora. Entonces se lavaron los pocillos cinco veces con una disolución de PBS-Tween-20 según métodos convencionales conocidos por los expertos habituales en la técnica. En un recipiente de reacción separado, se marcaron Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp5-1 con peroxidasa de rábano (HRP) usando el agente de reticulación 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para crear un conjugado, y se añadió este conjugado (3 μg/ml para el ejemplo 2) a cada pocillo que tenía Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp5-1 inmovilizados. Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó el conjugado no unido de los pocillos usando disolución de PBS-Tween-20 según métodos convencionales conocidos por los expertos habituales en la técnica. Entonces se añadieron 50 μl de sustrato de peroxidasa TMBLUE® (SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA) a cada pocillo y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras detener cada reacción enzimática con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% tras el periodo de incubación de 10 minutos, se midió el valor de densidad óptica (DO) de cada pocillo de la placa de 96 pocillos a A650 mediante técnicas espectrofotométricas convencionales usando un lector de placas ELISA para generar un "valor de DO650" (o, de manera más sencilla, un "valor de DO") para cada pocillo. En esta disposición, el valor de DO obtenido para cualquier pocillo particular de la placa de 96 pocillos era directamente proporcional a la cantidad de antígeno unido específicamente presente en el pocillo (si la IgG no estaba saturada).

EJEMPLO 1

Cuando se someten a prueba mediante ELISA en un formato de flujo lateral, Acp anti-DIV6728 se une específicamente a coproantígeno de gusano redondo, Acp anti-DIV6901 se une específicamente a coproantígeno de gusano látigo, y Acp anti-Asp5-1 se une específicamente a coproantígeno de gusano de gancho. No hubo unión cruzada a coproantígeno entre los anticuerpos helmínticos y sus helmínticos no específicos. La unión específica a coproantígeno de gusano redondo mediante Acp anti-DIV6728, coproantígeno de gusano látigo mediante Acp anti-DIV6901 y coproantígeno de gusano de gancho mediante Acp anti-Asp5-1 produce un cambio colorimétrico que puede observarse fácilmente por el ojo humano.

Un objetivo del ejemplo 1 era determinar si Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp 5-1 pueden usarse para capturar y unirse específicamente a sus respectivos coproantígenos helmínticos sin unión no específica en un ELISA de flujo lateral. El formato de flujo lateral que se usó fue un dispositivo de ensayo SNAP®, similar al que se describe en la patente estadounidense n.º 5.726.010. Además, se realizó el ensayo generalmente tal como se describe en esa misma patente. En resumen, entre otros componentes, el dispositivo de ensayo SNAP® incluía una cubeta de entrada de muestra, una matriz de flujo, una almohadilla de filtro previo de muestra para eliminar materia particulada que interfiere, una almohadilla de reactivo de unión específica, una zona reactiva y un depósito absorbente. Se inmovilizaron Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp 5-1 en forma de puntos pequeños, redondos, en la zona reactiva mediante secado. Entonces se bloqueó la zona reactiva con BSA. Se mezcló un extracto fecal combinado (150 μl) de animales caninos con infección por gusano redondo con 200 μl (1,0 μg/ml) de Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901, o Acp anti-Asp 5-1 conjugados (los anticuerpos se purificaron por afinidad antes de marcarse con HRP tal como se describió anteriormente). Se añadió esta mezcla a la cubeta de muestra y entonces se permitió que fluyera a lo largo de la matriz de flujo. Mientras se encontraban en la matriz de flujo, los anticuerpos marcados con HRP se unieron específicamente a sus respectivos coproantígenos helmínticos presentes en el extracto fecal. Se permitió que los complejos resultantes (es decir, los que incluían los anticuerpos marcados

con HRP y sus respectivos coproantígenos helmínticos) se unieran específicamente a los Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 o Acp anti-Asp 5-1 inmovilizados en la zona de reacción. Se invirtió el flujo a lo largo de la matriz de flujo poniendo en contacto el depósito absorbente con la matriz de flujo. En este momento, la disolución de detector y de lavado migraron al interior de la matriz de flujo para retirar cualquier componente no unido y para permitir la detección de cualquier complejo de analito que estuviera presente en el que el reactivo de captura estaba inmovilizado sobre la zona de reacción. (Esta etapa de detección duró aproximadamente ocho minutos). Se produjo la parada de la detección de los complejos de analito exponiendo los complejos de analito a azida de sodio al 0,1%.

Tal como se muestra en la figura 1C-E, la detección de complejos de analito específicos de helmintos en los que los anticuerpos específicos frente a gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho se inmovilizaron sobre zonas de reacción separadas era visiblemente evidente para una infección por gusano redondo (1D), una infección por gusano látigo (1E) y una infección por gusano de gancho (1C). En la muestra de control negativo mostrada en la figura 1A (disolución de diluyente sólo), no se detectaron complejos de analito. En una muestra de control negativa mostrada en la figura 1B, no se detectaron complejos de analito en los que el anticuerpo estaba inmovilizado sobre la zona de reacción de un dispositivo separado (la muestra de control negativa era una combinación de extractos fecales obtenidos de animales caninos que no albergaban una infección por helmintos). Por tanto, estos datos indican que pueden usarse Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp 5-1 en un formato de ELISA de flujo lateral para unirse separada y específicamente a su respectivo coproantígeno helmíntico. Esta unión específica es fácilmente visible por el ojo humano.

EJEMPLO 2

Cuando se someten a prueba mediante ELISA en un formato de placa de microtitulación, Acp anti-DIV6728 se une específicamente a coproantígeno de gusano redondo, pero no se une específicamente a coproantígeno de ninguno de gusano de gancho, gusano látigo o gusano del corazón; Acp anti-DIV6901 se une específicamente a coproantígeno de gusano látigo, pero no se une específicamente a coproantígeno de ninguno de gusano de gancho, gusano redondo o gusano del corazón; y Acp anti-Asp5-1 se une específicamente a coproantígeno de gusano de gancho, pero no se une específicamente a coproantígeno de ninguno de gusano redondo, gusano látigo o gusano del corazón. La unión específica de coproantígeno de gusano redondo mediante Acp anti-DIV6728, coproantígeno de gusano látigo mediante Acp anti-DIV6901 y coproantígeno de gusano de gancho mediante Acp anti-Asp5-1 produce un cambio colorimétrico que puede observarse fácilmente por el ojo humano.

Un objetivo del ejemplo 2 era determinar si la unión específica entre Acp anti-DIV6728 y coproantígeno de gusano redondo; Acp anti-DIV6901 y coproantígeno de gusano látigo; y Acp anti-Asp5-1 y coproantígeno de gusano de gancho, mientras los Acp anti-DIV6728, Acp anti-DIV6901 y Acp anti-Asp5-1 estaban inmovilizados sobre un soporte sólido, podía producir un cambio colorimétrico que puede observarse por el ojo humano.

Haciendo referencia a la figura 2, se inmovilizó Acp anti-DIV6728 (3 μg/ml) sobre las superficies inferiores de los pocillos D1-D12 y E1-E12, se inmovilizó Acp anti-DIV6901 sobre las superficies inferiores de los pocillos G1-G12 y H1-H12 y se inmovilizó Acp anti-Asp5-1 sobre las superficies inferiores de los pocillos A1-A12 y B1-B12 de una placa de microtitulación tal como se describió anteriormente. Después de tal inmovilización, se expusieron los pocillos A3, B3, D3, E3, G3 y H3 a extracto fecal de un animal canino con infección por gusano del corazón (indicado mediante “HW” en la figura 2). Se expusieron los pocillos A4, B4, D4, E4, G4 y H4 al extracto fecal de un primer animal canino con infección por gusano de gancho, se expusieron los pocillos A5, B5, D5, E5, G5, y H5 a extracto fecal de un segundo animal canino con infección por gusano de gancho, y se expusieron los pocillos A6, B6, D6, E6, G6 y H6 a extracto fecal de un tercer animal canino con infección por gusano de gancho. Se expusieron los pocillos A7, B7, D7, E7, G7 y H7 a extracto fecal de un primer animal canino con infección por gusano redondo, se expusieron los pocillos A8, B8, D8, E8, G8 y H8 a extracto fecal de un segundo animal canino con infección por gusano redondo, y se expusieron los pocillos A9, B9, D9, E9, G9 y H9 a extracto fecal de un tercer animal canino con infección por gusano redondo. Se expusieron los pocillos A10, B10, D10, E 10, G10 y H10 a extracto fecal de un primer animal canino con infección por gusano látigo, se expusieron los pocillos A11, B11, D11, E11, G11 y H11 a extracto fecal de un segundo animal canino con infección por gusano látigo y se expusieron los pocillos A 12, B 12, D 12, E12, G 12 y H12 a extracto fecal de un tercer animal canino con infección por gusano látigo. Se expusieron los pocillos A1, B1, D1, E1, G1 y H1 a rDIV6728, rDIV6901, y rAsp5-1 (1 □g/ml), y por tanto estos pocillos sirvieron como controles positivos. No se expusieron los pocillos A2, B2, D2, E2, G2 y H2 a ningún extracto fecal ni a rDIV6728, rDIV6901 ni rAsp5-1 y por tanto estos pocillos sirvieron como controles negativos. Tras lavar, se expusieron los pocillos D1-12 y E1-12 a Acp anti-rDIV6728 marcado con HRP; se expusieron los pocillos G1-G12 y H1-H12 a Acp anti-rDIV6901 marcado con HRP; se expusieron los pocillos A1-A12 y B1-B12 a Acp anti-rAsp 5-1 marcado con HRP a 3 μg/ml tal como se describió anteriormente.

Tras la incubación de todos estos pocillos con sustrato de peroxidasa TMBLUE® y la posterior adición del SDS, se observó visualmente el cambio colorimétrico en los pocillos de Acp anti-DIV6728 que se habían expuesto a extracto fecal de animales caninos con infección por gusano redondo (D7-D9 y E7-E9), pero no se observó cambio colorimétrico en ninguno de los pocillos de Acp anti-DIV6728 que se habían expuesto a extracto fecal de animales caninos con infección por cualquiera de gusano de gancho, gusano látigo o gusano del corazón. Se observó visualmente cambio colorimétrico en los pocillos de Acp anti-DIV6901 que se habían expuesto a extracto fecal de

animales caninos con infección por gusano látigo (G10-G12 y H10-H12), pero no se observó cambio colorimétrico en ninguno de los pocillos de Acp anti-DIV6901 que se habían expuesto a extracto fecal de animales caninos con infección por cualquiera de gusano de gancho, gusano redondo o gusano del corazón. Se observó visualmente cambio colorimétrico en los pocillos de Acp anti-Asp5-1 que se habían expuesto a extracto fecal de animales caninos con infección por gusano de gancho (A4-A6 y B4-B6), pero no se observó cambio colorimétrico en ninguno de los pocillos de Acp anti-Asp5-1 que se habían expuesto a extracto fecal de animales caninos con infección por cualquiera de gusano redondo, gusano látigo o gusano del corazón.

Estos datos indican que Acp anti-DIV6728 detecta gusano redondo; Acp anti-DIV6901 detecta gusano látigo; y Acp anti-Asp5-1 detecta gusano de gancho en un formato ELISA de manera suficiente para producir un cambio colorimétrico que es robusto y fácilmente visible por el ojo humano. Además, estos datos indican que tal cambio colorimétrico permite que el ojo humano distinga fácilmente entre las muestras fecales específicas de helmintos que contienen gusano redondo, gusano de gancho y gusano látigo

EJEMPLO 3

Una versión truncada de DIV6728, Copro6728, está presente en heces de animales caninos con infección por *T. canis*.

A. Preparación de muestra fecal de animales caninos

Animales caninos que se sabía que albergaban una infección por gusano redondo (*T. canis*) o que no tenían una infección por gusanos parásitos proporcionaron la fuente de muestras fecales. Se suspendió una muestra (aproximadamente 1 gramo) de heces de animales caninos congeladas, sin conservantes, combinadas a partir de cinco animales caninos con infección por gusano redondo o sin infección en 4 ml de tampón de extracción ("tampón de extracción" es 1X solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,0-7,5 con Tween-20 al 0,05%). Se agitó esta suspensión con vórtice durante 2 minutos y entonces se centrifugó a 13.000 rpm durante 25 minutos para producir un primer sobrenadante. Entonces se centrifugó este primer sobrenadante a 10.000 rpm durante 5 minutos para producir un segundo sobrenadante. Este segundo sobrenadante se denomina a continuación en el presente documento "extracto fecal".

B. Intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico puede enriquecer Copro6728 a partir de una muestra fecal. Se usaron muestras de PLRS para este estudio. En primer lugar se extrajo la muestra fecal con PBST (Tween 20 al 0,05%), pH 7,3. En primer lugar se diluyó la muestra con tampón de citrato de sodio, pH 3,0 y luego se ajustó el pH a 3 con HCl. Finalmente, se centrifugó la muestra y se cargó el sobrenadante en una columna de sulfopropilo (SP). Se eluyó la columna de SP con tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 3 con NaCl 1 M, y se evaluaron las fracciones de elución mediante ELISA. Se recubrió la placa de ELISA con IgG de conejo anti-6728 a 3 μg/ml. Basándose en los resultados mostrados en la figura 15, queda claro que Copro6728 puede purificarse parcialmente y enriquecerse eluyendo la columna de SP con tampón de citrato de sodio con NaCl 1 M y Copro6728 está en la fracción entre A11 y C9 (figura 15).

C. Inmunotransferencia de tipo Western y SDS-PAGE

La inmunotransferencia de tipo Western y gel de SDS-PAGE mostraron que el peso molecular de Copro6728 es de aproximadamente 7 kD. Se mezclaron fracciones de elución de la columna de SP y se ajustó el pH de tampón a 7 con NaOH antes de cargarlo en una columna de afinidad, que se preparó uniendo la IgG de conejo anti-6728 con resina AminoLink (Pierce, Thermo Scientific). Se lavó la columna y se eluyó según las instrucciones del fabricante. Se cargaron las fracciones de elución en un gel de gradiente de Bis-Tris a del 4-12% de 10 pocillos y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para la inmunotransferencia de tipo Western. La inmunotransferencia de tipo Western, analizada con sonda de IgG de conejo anti-6728-HRP, mostró que la banda principal (Copro6728) era de aproximadamente 7 kD (flecha roja en la figura 16). Tras la concentración adicional, se visualizaron las mismas muestras sobre un gel de SDS-PAGE con tinción de proteína Imperial (Pierce, Thermo Scientific). Es visible una banda de 7 kD correspondiente al tamaño indicado por IgG anti-6728-HRP (flecha roja en la figura 17).

D. Análisis de espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas en la banda cortada del gel de SDS-PAGE (señalada mediante una flecha roja en la figura 17) indicó que esta banda contiene Copro6728, y que la porción C-terminal de DIV6728 contiene Copro6728.

La banda de 7 kD que corresponde a la banda de 7 kD en la inmunotransferencia de tipo Western se cortó del gel de SDS-PAGE y se envió a Keck Center en la Universidad de Yale para el análisis de espectrometría de masas. En primer lugar se digirió por tripsina la muestra en el gel y entonces se analizó mediante CL-EM/EM usando el Q-Tof del espectrómetro de masas Ultima (Waters). Se encontraron dos péptidos específicos en la muestra mediante

análisis de espectrometría de masas: Péptido 1: R.FVPCTR.N (SEQ ID NO: 35) y Péptido 2: R.DAEGNCIK.F (SEQ ID NO: 36).

El análisis de alineación en las secuencias de DIV6728 (SEQ ID NO: 21) y los dos péptidos identificados mediante análisis de EM indicó que ambos péptidos están ubicados en el extremo C-terminal de DIV6728 de longitud completa, confirmando que la banda de 7 kD identificada mediante inmunotransferencia de tipo Western se deriva de DIV6728. La ubicación de las dos secuencias peptídicas indica que una porción C-terminal de DIV6728 (Copro6728) estaba presente en las muestras fecales positivas para *T. canis*. La figura 18 muestra la longitud completa de DIV6728 (SEQ ID NO: 21) con los dos péptidos identificados mediante el análisis de EM resaltados en los recuadros sombreados.

EJEMPLO 4

Se generaron dos proteínas recombinantes que corresponden a 64 aminoácidos dentro de la porción N-terminal de DIV6728 y 65 aminoácidos dentro de la porción C-terminal de DIV6728.

Basándose en los datos del análisis de EM, inmunotransferencia de tipo Western y SDS-PAGE, se prepararon dos nuevos constructos de expresión que codificaban para truncamientos de DIV6728. Se denominaron 6728N (SEQ ID NO: 37) y 6728C (SEQ ID NO: 38) para el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de DIV6728 de longitud completa, respectivamente. La figura 19 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de 6728N (SEQ ID NO: 37) y 6728C (SEQ ID NO: 38) codificadas por los constructos.

A. Genes sintéticos para expresar 6728N y 6728C recombinantes

Se optimizaron mediante codón los genes para expresar polipéptidos de 6728N y 6728C para la expresión en *E. coli,* se sintetizaron y se clonaron en el vector pET28(a) con etiquetas de seis His(6) en el extremo N-terminal de cada proteína recombinante mediante GeneArt, (Josef-Engert-Str. 11D-93053 Regensburg, Alemania).

B. Expresión de proteínas recombinantes 6728N y 6728C

Se expresaron las proteínas recombinantes 6728N y 6728C en *E. coli* BL21(DE3) y se purificaron con una columna de níquel individual. Se transformó el plásmido pET28(a) 6728N dentro de BL21 (DE3), se hizo crecer hasta una DO de ~0,8 y se indujo con IPTG 1 mM (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranósido) a 37ºC durante 2 horas. Se lisaron las células con procesador Microfluidizer®, M-11EH. 6728N recombinante era soluble en el tampón Tris 20 mM, pH 8,0, con NaCl 500 mM y se purificó mediante elución gradual de la columna de níquel con concentraciones diferentes de imidazol en el tampón Tris 20 mM, pH 8,0, con NaCl 500 mM. Se eluyó 6728N recombinante de la columna de níquel mediante el mismo tampón con imidazol 500 mM. La figura 20 es un gel de SDS-PAGE cargado con diferentes muestras para comprobar la purificación de 6728N recombinante. 6728N recombinante tiene aproximadamente ~12 kD de tamaño (carril 9) en el gel.

Se transformó el plásmido pET28(a) 6728C dentro de BL21 (DE3), se hizo crecer hasta una DO de ~0,8 y se indujo con IPTG 1 mM (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranósido) a 37ºC durante 2 horas. Se lisaron las células con procesador Microfluidizer®, M-11EH. 6728C recombinante era soluble en el tampón Tris 20 mM, pH 8,0, con NaCl 500 mM y se purificó mediante elución gradual de la columna de níquel con concentraciones diferentes de imidazol en el tampón Tris 20 mM, pH 8,0, con NaCl 500 mM. Se eluyó 6728C recombinante de la columna de níquel mediante el mismo tampón con imidazol 500 mM. La figura 21 es un gel de SDS-PAGE cargado con diferentes muestras para confirmar la purificación de 6728C recombinante. 6728C recombinante tiene aproximadamente ~12 kD de tamaño (carril 9) en este gel.

C. Anticuerpos policlonales de conejo

El anticuerpo policlonal de conejo obtenido contra 6728C detecta antígeno en ELISA fecal, mientras que el anticuerpo policlonal contra 6728N no detecta antígeno en ELISA fecal

Se usaron proteínas recombinantes 6728N y 6728C, purificadas con una columna de níquel individual, se usaron para inmunizar conejos para la producción de anticuerpos policlonales. Se purificaron por afinidad anticuerpos policlonales de los sueros de conejos inmunizados con resina de proteína G y se usaron para recubrir placas Immulon I a 2 μg/ml. Se sometieron a prueba cuatro muestras de animales caninos diferentes con placas recubiertas con anticuerpos diferentes. Los anticuerpos de los dos conejos inmunizados con 6728C recombinante podían diferenciar las muestras fecales positivas para *T. canis* de muestras positivas para gusano de gancho, gusano látigo y muestras negativas para nematodos. Sin embargo, los anticuerpos de los dos conejos inmunizados con 6728N recombinante no podían diferenciar las muestras fecales positivas para *T. canis* de muestras positivas para gusano de gancho, gusano látigo ni muestras negativas para nematodo (figura 22). Estos datos de ELISA demuestran adicionalmente que Copro6728 es una porción C-terminal de DIV6728 de longitud completa. Experimentos adicionales mostraron que anticuerpos obtenidos contra 6728N y 6728C sólo reconocen sus proteínas recombinantes relacionadas sin reactividad cruzada (figura 23). Ambos de estos anticuerpos policlonales reaccionan

con DIV6728 recombinante de longitud completa tal como se espera (figura 23).

D. Inmunotransferencia de tipo Western

El anticuerpo policlonal de conejo contra 6728C recombinante puede reconocer las muestras fecales positivas para *T. canis* en inmunotransferencia de tipo Western, pero no el anticuerpo policlonal contra 6728N recombinante. Además de extracto de gusano completo *T. canis* (carril 1), se repartieron muestras fecales negativas para nematodos (carriles 2-4) y positivas para *T. canis* (carriles 5-7) mediante columna de SP con tampón de elución con alto contenido en sal (NaCl 1 M en tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 3). Se cargaron extracto de gusano *T. canis* (carril 1), muestras cargadas en la columna (carril 2 y 5), fracción no retenida de la columna (carril 3 y 6) y elución de columna (carril 4 y 7) en gel de gradiente de Bis-Tris a del 4-12% de 10 pocillos, y entonces se transfirieron adicionalmente a membrana de nitrocelulosa, analizada con sonda de diferentes conjugados tal como se indica en las figuras 24-26. Tanto la IgG anti-6728 de longitud completa-HRP como la IgG anti-6728C-HRP podían diferenciar la muestra fecal positiva para *T. canis* de las muestras fecales negativas para nematodos (figura 24 y 25). Sin embargo, la IgG anti-6728N-HRP no podía diferenciar estas dos muestras fecales diferentes (figura 26). Estos datos confirmaron adicionalmente que Copro6728 sólo tiene aproximadamente la mitad del tamaño de DIV6728 de longitud completa, de acuerdo con los datos obtenidos del análisis de espectrometría de masas y ELISA fecal.

Lista de secuencias

<110> Idexx Laboratories, Inc.
Elsemore, David Allen
Geng, Jinming
Flynn, Laurie A.
Crawford, Michael

<120> Métodos, dispositivos, kits y composiciones para detectar gusano redondo, gusano látigo y gusano de gancho

<130> 08-1283-WO

<150> Documento 61/122260
<151> 12-12-2008

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 1210
<212> ADN
<213> *Trichuris vulpis*

<400> 1

cattcactgc ggttgtaaaa gcagtgcaga aatgaggctg gtcttccatg cggttattta 60

cctcacattg gggttcctca ccgacgccgt aagagaaaaa cgtggcaaat gtcctcctga 120

accaccgatc gcaggaaaca cgatctactg ccgcgatgat tttgattgtg gaggaagaca 180

gaagtgctgt acaattgcag aaggacgtgg atgcgtgccg ccctatggtg aacaacattt 240

cgaagtggtg aaaccgggtc attgcccagc tattccagcg gttacgggca tggcgaactt 300

ctgtaacact gatggcgact gtgatggacc gaaaaaatgt tgtctcacat cgcgcggcta 360

cgattgcaca catccattac acttcccaat ccagccacaa cctccagtag gacagtgccc 420

tccttcaaag ccccgtatcc caggaaaatg ggtagacatc tgcgctaagc atgccaactg 480

cccagaccca gagaagtgtt gcgacacgga gtatggcaac cgatgtatgg atgttggatt 540

agtgccagga caaggagaaa gaccaggcaa ttgcccgaac gaaccacgaa taagaggaac 600

taaatacgat tgccgacgag acgatgactg cgacggtgtg cagaaatgct gcttcactgt 660

tgagggacgt gagtgcgtgg aaccaagtag aaaaccactg gacaagcccg gacattgtcc 720

accaattccc gctgatgtgg gctcagccag gtactgcgac actgatcggg attgtgatgg 780

accaagaaaa tgctgcctct cttcgcgtgg ctatgaatgt aaacatccag tacactatcc 840

cgatcgagtg gagccactag taggagaatg cccaccatca cgacctcgca ttcctgggaa 900

atgggttgac atctgctcta agcatgccaa ctgcccagac ccagagaaat gttgcgacac 960

ggagtatggc aaccgatgta tggacgttgg attagtgcct ggacaaggag aaaaacctgc 1020

caactgccca aaggaaccac gaataagagg aactaagtac gactgtcgac gggacgatga 1080
ctgcgatggg aaacaaaagt gctgctacac aactgaaggc cgcgaatgcg tccatggtat 1140

atggccttaa atggttgctt cttcctataa taaaagcaaa cgaatcaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa 1210

<210> 2
<211> 1059
<212> ADN
<213> *Trichuris vulpis*

<400> 2

```
gtaagagaaa aacgtggcaa atgtcctcct gaaccaccga tcgcaggaaa cacgatctac     60
tgccgcgatg attttgattg tggaggaaga cagaagtgct gtacaattgc agaaggacgt    120
ggatgcgtgc cgccctatgg tgaacaagat ttcgaagtgg tgaaaccggg tcattgccca    180
gctattccag cggttacggg catggcgaac ttctgtaaca ctgatggcga ctgtgatgga    240
ccgaaaaaat gttgtctcac atcgcgcggc tacgattgta cacatccgtt acacttccca    300
atccagccac aacctccagt aggacagtgc cctccttcaa agccccgtgt tccaggaaaa    360
tgggtagaca tctgcgctaa gcatgccaat tgcccagacc cagagaagtg ttgcgacacg    420
gagtatggca accgatgtat ggatgttgga ttagtggcag gacaaggaga aagaccaggc    480
aattgcccga acgaaccacg aataagagga actaaatacg attgccgacg agacgatgac    540
tgcgacggtg tgcagaaatg ctgcttcact gttgagggac gtgagtgcgt ggaaccaagc    600
agaaaaccac tggacaagcc cggacattgt ccaccaattc ccgctgatgt gggctcagcc    660
aggtactgcg acactgatcg ggattgtgat ggaccaagaa aatgctgcct ctcttcgcgt    720
ggctatgaat gtaaacatcc agtacactat cccgatcgag tggagccact agtaggagaa    780
tgcccaccat cacgacctcg cattcctggg aaatgggttg acatctgctc taagcatgcc    840
aactgcccag acccagagaa atgttgcgac acggagtatg gcaaccgatg tatggacgtt    900
ggattagtgc ctggacaagg agaaaaacct gccaactgcc caaaggaacc acgaataagg    960
ggaactaagt acgactgtcg acgggacgat gactgcgatg ggaaacaaaa gtgctgctac   1020
acaactgaag gccgcgaatg cgtccatggt atatggcct                           1059
```

<210> 3
<211> 372
<212> PRT
<213> *Trichuris vulpis*

<400> 3

```
Met Arg Leu Val Phe His Ala Val Ile Tyr Leu Thr Leu Gly Phe Leu
1               5                  10                  15
```

```
Thr Asp Ala Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro
            20                  25                  30

Ile Ala Gly Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly
        35                  40                  45

Arg Gln Lys Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro
    50                  55                  60

Tyr Gly Glu Gln His Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala
65                  70                  75                  80

Ile Pro Ala Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp
                85                  90                  95

Cys Asp Gly Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys
            100                 105                 110

Thr His Pro Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln
        115                 120                 125

Cys Pro Pro Ser Lys Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys
    130                 135                 140

Ala Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu
145                 150                 155                 160

Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro Gly Gln Gly Glu
                165                 170                 175

Arg Pro Gly Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr
            180                 185                 190

Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe
        195                 200                 205

Thr Val Glu Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp
    210                 215                 220

Lys Pro Gly His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg
225                 230                 235                 240

Tyr Cys Asp Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu
                245                 250                 255
```

Ser Ser Arg Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg
260 265 270

Val Glu Pro Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro
275 280 285

Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro
290 295 300

Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly
305 310 315 320

Leu Val Pro Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro
325 330 335

Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp
340 345 350

Gly Lys Gln Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His
355 360 365

Gly Ile Trp Pro
370

<210> 4
<211> 353
<212> PRT
<213> *Trichuris vulpis*

<400> 4

Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro Ile Ala Gly
1 5 10 15

Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly Arg Gln Lys
20 25 30

Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro Tyr Gly Glu
35 40 45

Gln Asp Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala Ile Pro Ala
50 55 60

Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp Cys Asp Gly
65 70 75 80

Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His Pro
85 90 95

```
Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro Pro
            100                 105                 110

Ser Lys Pro Arg Val Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys His
        115                 120                 125

Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn
    130                 135                 140

Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Ala Gly Gln Gly Glu Arg Pro Gly
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg
                165                 170                 175

Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe Thr Val Glu
            180                 185                 190

Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro Gly
        195                 200                 205

His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys Asp
    210                 215                 220

Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser Arg
225                 230                 235                 240

Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu Pro
                245                 250                 255

Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp
            260                 265                 270

Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys
        275                 280                 285

Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro
    290                 295                 300

Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile Arg
305                 310                 315                 320

Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys Gln
                325                 330                 335
Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile Trp
            340                 345                 350

Pro
```

<210> 5
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5

```
Met Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro Ile Ala
1               5                  10                  15

Gly Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly Arg Gln
            20                  25                  30

Lys Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro Tyr Gly
        35                  40                  45

Glu Gln His Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala Ile Pro
    50                  55                  60

Ala Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp Cys Asp
65                  70                  75                  80

Gly Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His
                85                  90                  95

Pro Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro
            100                 105                 110

Pro Ser Lys Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys
        115                 120                 125

His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly
    130                 135                 140

Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro Gly Gln Gly Glu Arg Pro
145                 150                 155                 160

Gly Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys
                165                 170                 175
```

```
Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe Thr Val
            180                 185                 190

Glu Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro
        195                 200                 205

Gly His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys
    210                 215                 220

Asp Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser
225                 230                 235                 240

Arg Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu
                245                 250                 255

Pro Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys
            260                 265                 270

Trp Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys
        275                 280                 285

Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val
    290                 295                 300

Pro Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile
305                 310                 315                 320

Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys
                325                 330                 335

Gln Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile
            340                 345                 350

Trp Pro
```

<210> 6
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 6

```
Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro Ile Ala Gly
```

```
1               5                   10                  15

Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly Arg Gln Lys
            20                  25                  30

Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro Tyr Gly Glu
        35                  40                  45

Gln His Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala Ile Pro Ala
    50                  55                  60

Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp Cys Asp Gly
65                  70                  75                  80

Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His Pro
                85                  90                  95

Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro Pro
            100                 105                 110

Ser Lys Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys His
        115                 120                 125

Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn
    130                 135                 140

Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro Gly Gln Gly Glu Arg Pro Gly
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg
                165                 170                 175

Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe Thr Val Glu
            180                 185                 190

Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro Gly
        195                 200                 205

His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys Asp
    210                 215                 220

Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser Arg
225                 230                 235                 240

Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu Pro
                245                 250                 255
```

Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp
260 265 270

Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys
275 280 285

Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro
290 295 300

Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile Arg
305 310 315 320

Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys Gln
325 330 335

Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile Trp
340 345 350

Pro

<210> 7
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 7

Met Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro Ile Ala
1 5 10 15

Gly Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly Arg Gln
20 25 30

Lys Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro Tyr Gly
35 40 45

Glu Gln Asp Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala Ile Pro
50 55 60

Ala Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp Cys Asp
65 70 75 80

Gly Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His

```
                85                  90                  95

Pro Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro
            100                 105                 110

Pro Ser Lys Pro Arg Val Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys
        115                 120                 125

His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly
    130                 135                 140

Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Ala Gly Gln Gly Glu Arg Pro
145                 150                 155                 160

Gly Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys
                165                 170                 175

Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe Thr Val
            180                 185                 190

Glu Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro
        195                 200                 205

Gly His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys
    210                 215                 220

Asp Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser
225                 230                 235                 240

Arg Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu
                245                 250                 255

Pro Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys
            260                 265                 270

Trp Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys
        275                 280                 285

Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val
    290                 295                 300

Pro Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile
305                 310                 315                 320

Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys
                325                 330                 335
```

Gln Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile
340 345 350

Trp Pro

<210> 8
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 8

Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro Ile Ala Gly
1 5 10 15

Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Phe Asp Cys Gly Gly Arg Gln Lys
20 25 30

Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro Tyr Gly Glu
35 40 45

Gln Asp Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala Ile Pro Ala
50 55 60

Val Thr Gly Met Ala Asn Phe Cys Asn Thr Asp Gly Asp Cys Asp Gly
65 70 75 80

Pro Lys Lys Cys Cys Leu Thr Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His Pro
85 90 95

Leu His Phe Pro Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro Pro
100 105 110

Ser Lys Pro Arg Val Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys His
115 120 125

Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn
130 135 140

Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Ala Gly Gln Gly Glu Arg Pro Gly
145 150 155 160

Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg

```
                165                 170                 175

Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Phe Thr Val Glu
            180                 185                 190

Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro Gly
        195                 200                 205

His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys Asp
    210                 215                 220

Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser Arg
225                 230                 235                 240

Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu Pro
                245                 250                 255

Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp
            260                 265                 270

Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys
        275                 280                 285

Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro
    290                 295                 300

Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile Arg
305                 310                 315                 320

Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys Gln
                325                 330                 335

Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile Trp
            340                 345                 350

Pro
```

<210> 9
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature

<222> (69)..(69)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (134)..(134)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (170)..(170)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 9

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                  10                  15

Xaa Xaa Xaa Val Arg Glu Lys Arg Gly Lys Cys Pro Pro Glu Pro Pro
            20                  25                  30

Ile Ala Gly Asn Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Asp Glu Asp Cys Gly Gly
        35                  40                  45

Arg Gln Lys Cys Cys Thr Ile Ala Glu Gly Arg Gly Cys Val Pro Pro
    50                  55                  60

Tyr Gly Glu Gln Xaa Phe Glu Val Val Lys Pro Gly His Cys Pro Ala
65                  70                  75                  80

Ile Pro Ala Val Thr Gly Met Ala Asn Glu Cys Asn Ile Asp Gly Asp
                85                  90                  95

Cys Asp Gly Met Cys Cys Leu Ile Ser Arg Gly Tyr Asp Cys Thr His
            100                 105                 110

Pro Leu His Glu Thr Ile Gln Pro Gln Pro Pro Val Gly Gln Cys Pro
        115                 120                 125

Pro Ser Lys Pro Arg Xaa Pro Gly Lys Trp Val Asp Ile Cys Ala Lys
    130                 135                 140

His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys Cys Asp Thr Glu Tyr Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Xaa Gly Gly Glu Arg Pro Gly
                165                 170                 175

Asn Cys Pro Asn Glu Pro Arg Ile Arg Gly Ile Lys Tyr Asp Cys Arg
            180                 185                 190

Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Val Gln Lys Cys Cys Glu Thr Val Glu
        195                 200                 205

Gly Arg Glu Cys Val Glu Pro Ser Arg Lys Pro Leu Asp Lys Pro Gly
    210                 215                 220

His Cys Pro Pro Ile Pro Ala Asp Val Gly Ser Ala Arg Tyr Cys Asp
225                 230                 235                 240

Thr Asp Arg Asp Cys Asp Gly Pro Arg Lys Cys Cys Leu Ser Ser Arg
                245                 250                 255

Gly Tyr Glu Cys Lys His Pro Val His Tyr Pro Asp Arg Val Glu Pro
            260                 265                 270

Leu Val Gly Glu Cys Pro Pro Ser Arg Pro Arg Ile Pro Gly Lys Trp
        275                 280                 285

Val Asp Ile Cys Ser Lys His Ala Asn Cys Pro Asp Pro Glu Lys Cys
    290                 295                 300

Cys Asp Thr Glu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Asp Val Gly Leu Val Pro
305                 310                 315                 320

Gly Gln Gly Glu Lys Pro Ala Asn Cys Pro Lys Glu Pro Arg Ile Arg
                325                 330                 335

Gly Thr Lys Tyr Asp Cys Arg Arg Asp Asp Asp Cys Asp Gly Lys Gln
            340                 345                 350

Lys Cys Cys Tyr Thr Thr Glu Gly Arg Glu Cys Val His Gly Ile Trp
        355                 360                 365

Pro
```

<210> 10
<211> 865
<212> ADN
<213> *Toxocara canis*

<400> 10

caagaagatt tatggtgtgg cagcttcgag acgaaggagg catcacttca cgctcgaaaa 60

cagtctggac acccacctga aatggcttag ccacgagcaa aaggaggaac tgctgcaaat 120

gaagaaggac ggcaaatcga agaaggagct ccaggataag atcatgcact attacgagca 180

cctcgaaggc gatgcgaaac atgaagcaac agagcaactg aagggcggat gccgcgagat 240

tcttaagcat gttgttggcg aggagaaagc agctgagatc aaagcactga aagattctgg 300

agcaagcaaa gatgagctta aagccaaggt cgaagaggca ctccacgcag tcaccgacga 360

agaaaagaag caacatatcg ccgaattcgg tcccgcatgc aagaagattt atggtgtggc 420

agcttcgaga cgaaggaggc atcacttcac gctcgaaaac agtctggaca cccacctgaa 480

atggcttagc cacgagcaaa aggaggaact gctgcaaatg aagaaggacg gcaaatcgaa 540

gaaggagctc caggataaga tcatgcacta ttacgagcac ctcgaaggga tgctcctcgc 600

gctatgtatc ctgtattgac ggccttccaa cctatcacac ctgtcagtgc ggccttacat 660

tcgacgagcg tagaaagacc tgtcttccta agcagctggt aaagtactgc ggaatcccag 720

aatctggaga ggcgtcggcg gaagttggtg agtcgtacta acacagcacg ctctcgttgg 780

tgcagatgtt gtgtgaaata cttttgtcag ttttccgtgt gttttaaata aataaaaaat 840

tccgtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 865

<210> 11
<211> 632
<212> ADN
<213> *Toxocara cati*

<400> 11

atttatggtg tggcagcttc gagacgaagg aggcatcact tcacgctcga aaaaagtctg 60

gacacccacc tgaaatggct tagccacgag caaaaggagg aactgctgaa aatgaagaaa 120

gatgggaaat cgaagaagga gctccaggat aaggtgatgc acttctacga gcacctcgaa 180

ggcgatgcga aacatgaagc aacagagcaa ctgaagggcg gatgccgcga gatccttaag 240

catgttgttg gtgaggagaa agcagctgag atcaaagcac tgaaagattc tggagcaagc 300

aaagatgagc ttaaagccaa ggtcgaagat gcactccacg cggtcaccga agaagaaaag 360

aagcaacata tcgccgaatt tggtccagca tgcaaggaaa ttttcggggt gccggttgat 420

gttcgtcaca aacgcgaccc ttatactaat atgacgcccg atgaagttgc tgaaggacta 480

agaagttaac ggtgatcgag ctttttgcaa aaactggttg atgcttttaa attcttttaa 540

gccttttttct tgtgttattt cggaattgta ccacacgaac agttagttcc gaataaagaa 600

ctgtaattat gtaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 632

<210> 12
<211> 205
<212> PRT
<213> *Toxocara canis*

<400> 12

```
Lys Lys Ile Tyr Gly Val Ala Ala Ser Arg Arg Arg Arg His His Phe
1               5                  10                  15

Thr Leu Glu Asn Ser Leu Asp Thr His Leu Lys Trp Leu Ser His Glu
            20                  25                  30

Gln Lys Glu Glu Leu Leu Gln Met Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Lys
        35                  40                  45

Glu Leu Gln Asp Lys Ile Met His Tyr Tyr Glu His Leu Glu Gly Asp
    50                  55                  60

Ala Lys His Glu Ala Thr Glu Gln Leu Lys Gly Gly Cys Arg Glu Ile
65                  70                  75                  80

Leu Lys His Val Val Gly Glu Glu Lys Ala Ala Glu Ile Lys Ala Leu
                85                  90                  95

Lys Asp Ser Gly Ala Ser Lys Asp Glu Leu Lys Ala Lys Val Glu Glu
            100                 105                 110

Ala Leu His Ala Val Thr Asp Glu Glu Lys Lys Gln His Ile Ala Glu
        115                 120                 125

Phe Gly Pro Ala Cys Lys Lys Ile Tyr Gly Val Ala Ala Ser Arg Arg
    130                 135                 140

Arg Arg His His Phe Thr Leu Glu Asn Ser Leu Asp Thr His Leu Lys
145                 150                 155                 160

Trp Leu Ser His Glu Gln Lys Glu Glu Leu Leu Gln Met Lys Lys Asp
                165                 170                 175

Gly Lys Ser Lys Lys Glu Leu Gln Asp Lys Ile Met His Tyr Tyr Glu
            180                 185                 190

His Leu Glu Gly Met Leu Leu Ala Leu Cys Ile Leu Tyr
        195                 200                 205
```

<210> 13
<211> 162
<212> PRT
<213> *Toxocara cati*

<400> 13

```
Ile Tyr Gly Val Ala Ala Ser Arg Arg Arg Arg His His Phe Thr Leu
1               5                  10                  15

Glu Lys Ser Leu Asp Thr His Leu Lys Trp Leu Ser His Glu Gln Lys
            20                  25                  30

Glu Glu Leu Leu Lys Met Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Lys Glu Leu
        35                  40                  45

Gln Asp Lys Val Met His Phe Tyr Glu His Leu Glu Gly Asp Ala Lys
    50                  55                  60

His Glu Ala Thr Glu Gln Leu Lys Gly Gly Cys Arg Glu Ile Leu Lys
65                  70                  75                  80

His Val Val Gly Glu Glu Lys Ala Ala Glu Ile Lys Ala Leu Lys Asp
                85                  90                  95

Ser Gly Ala Ser Lys Asp Glu Leu Lys Ala Lys Val Glu Asp Ala Leu
            100                 105                 110

His Ala Val Thr Asp Glu Glu Lys Lys Gln His Ile Ala Glu Phe Gly
        115                 120                 125

Pro Ala Cys Lys Glu Ile Phe Gly Val Pro Ile Asp Val Arg His Lys
    130                 135                 140

Arg Asp Pro Tyr Thr Asn Met Thr Pro Asp Glu Val Ala Glu Gly Leu
145                 150                 155                 160

Arg Ser
```

<210> 14
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 14

```
Met His His Phe Thr Leu Glu Asn Ser Leu Asp Thr His Leu Lys Trp
1               5                  10                  15
```

Leu Ser His Glu Gln Lys Glu Glu Leu Leu Gln Met Lys Lys Asp Gly
20 25 30

Lys Ser Lys Lys Glu Leu Gln Asp Lys Ile Met His Tyr Tyr Glu His
35 40 45

Leu Glu Gly Asp Ala Lys His Glu Ala Thr Glu Gln Leu Lys Gly Gly
50 55 60

Cys Arg Glu Ile Leu Lys His Val Val Gly Glu Glu Lys Ala Ala Glu
65 70 75 80

Ile Lys Ala Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Lys Asp Glu Leu Lys Ala
85 90 95

Lys Val Glu Glu Ala Leu His Ala Val Thr Asp Glu Glu Lys Lys Gln
100 105 110

His Ile Ala Glu Phe Gly Pro Ala Cys Lys Lys Ile Tyr Gly Val Ala
115 120 125

Ala Ser
130

<210> 15
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 15

His His Phe Thr Leu Glu Asn Ser Leu Asp Thr His Leu Lys Trp Leu
1 5 10 15

Ser His Glu Gln Lys Glu Glu Leu Leu Gln Met Lys Lys Asp Gly Lys
20 25 30

Ser Lys Lys Glu Leu Gln Asp Lys Ile Met His Tyr Tyr Glu His Leu
35 40 45

Glu Gly Asp Ala Lys His Glu Ala Thr Glu Gln Leu Lys Gly Gly Cys
50 55 60

Arg Glu Ile Leu Lys His Val Val Gly Glu Glu Lys Ala Ala Glu Ile

65 70 75 80

Lys Ala Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Lys Asp Glu Leu Lys Ala Lys
85 90 95

Val Glu Glu Ala Leu His Ala Val Thr Asp Glu Glu Lys Lys Gln His
100 105 110

Ile Ala Glu Phe Gly Pro Ala Cys Lys Lys Ile Tyr Gly Val Ala Ala
115 120 125

Ser

<210> 16
<211> 155
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (11)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(110)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)..(133)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)..(135)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)..(155)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 16

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His His Phe Thr Leu
1 5 10 15

Glu Xaa Ser Leu Asp Thr His Leu Lys Trp Leu Ser His Glu Gln Lys
20 25 30

Glu Glu Leu Leu Xaa Met Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Lys Glu Leu
35 40 45

Gln Asp Lys Xaa Met His Xaa Tyr Glu His Leu Glu Gly Asp Ala Lys
50 55 60

His Glu Ala Thr Glu Gln Leu Lys Gly Gly Cys Arg Glu Ile Leu Lys
65 70 75 80

His Val Val Gly Glu Glu Lys Ala Ala Glu Ile Phe Ala Leu Lys Asp
85 90 95

Ser Gly Ala Ser Lys Asp Glu Leu Lys Ala Lys Val Glu Xaa Ala Leu
100 105 110

His Ala Val Thr Asp Glu Glu Lys Lys Gln His Ile Ala Glu Phe Gly
115 120 125

Phe Ala Cys Lys Xaa Ile Xaa Gly Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150 155

<210> 17
<211> 535
<212> ADN
<213> *Toxocara canis*

<400> 17

agtcagtagc cactttaatc catcagaatg ctctctgttc ttgcgctttt cgctcttatt 60

actttttgctg tggccggtcc ggaaagctgc ggtccaaacg aagtgtggac tgaatgtacc 120

ggttgcgaat tgaaatgtgg gcaagatgaa aatacgccgt gcacactaaa ctgtcgaccg 180

ccgtgatgtg agtgctctcc aggaagaggc atgagacgaa ccaacgatgg aaggtgcatt 240

ccggctagtc agtgcccgca acacagggcc aagagagagg agcaatgcaa gccaaatgag 300

cagtggtcac cgtgccgagg atgtgaagga acatgcgcac aaagatttgt cccttgcact 360

agaaactgcc gaccaccagg ctgtgaatgc gttgctggcg caggtttcgt acgtgacgct 420

gaaggaaact gcatcaagtt cgacgattgc ccgaagtaaa taataaccat acaaattgct 480

gattccaatt aaaataataa atgagtccag ctgttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 535

<210> 18
<211> 536
<212> ADN
<213> *Toxocara cati*

<400> 18

cagtcagcag ctacttttat ccatcggaat gctctctgtt cttgcgcttt tcgctcttat 60

tactttcgct gtggccgatc cgaaaagttg cggtccaaac gaagtgtgga ctgaatgtac 120

cggttgcgag ttgaaatgcg ggcaggatga ggatacgccg tgcacactaa actgtcggcc 180

gccgtcatgt gagtgctcac caggaagagg catgagacga accgacgatg ggaggtgcat 240

tccggctagt cagtgcccgc aacacagagc caagagagag gagcagtgca agccaaatga 300

gcagtggtca ccgtgccgag gatgtgaagg aacatgcgca caaagatttg tcccttgcac 360

tagaaactgc cgaccaccag gatgtgaatg cgttgctggc gcaggtttcg tacgtgacgc 420

tgcaggaaat tgcatcaagt tcgacgattg cccgaagtaa ataataacca tactaattgc 480

tgattacaat taaaataata aatgagtcca gctgttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 536

<210> 19
<211> 143
<212> PRT
<213> *Toxocara canis*

<400> 19

Met Leu Ser Val Leu Ala Leu Phe Ala Leu Ile Thr Phe Ala Val Ala
1 5 10 15

Gly Pro Glu Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr Gly
20 25 30

Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Asn Thr Pro Cys Thr Leu Asn
35 40 45

Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg Arg
50 55 60

Thr Asn Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His Arg
65 70 75 80

Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser Pro Cys
85 90 95

Arg Gly Cys Glu Gly Thr Cys Ala Gln Arg Phe Val Pro Cys Thr Arg
100 105 110

Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly Phe Val
115 120 125

Arg Asp Ala Glu Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
130 135 140

<210> 20
<211> 143
<212> PRT
<213> *Toxocara cati*

<400> 20

Met Leu Ser Val Leu Ala Leu Phe Ala Leu Ile Thr Phe Ala Val Ala
1 5 10 15

Asp Pro Lys Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr Gly
20 25 30

Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Asp Thr Pro Cys Thr Leu Asn
35 40 45

Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg Arg
50 55 60

Thr Asp Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His Arg
65 70 75 80

Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser Pro Cys
85 90 95

Arg Gly Cys Glu Gly Thr Cys Ala Gln Arg Phe Val Pro Cys Thr Arg
100 105 110

Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly Phe Val

115 120 125

Arg Asp Ala Ala Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
130 135 140

<210> 21
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 21

Met Gly Pro Glu Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr
1 5 10 15

Gly Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Asn Thr Pro Cys Thr Leu
20 25 30

Asn Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg
35 40 45

Arg Thr Asn Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His
50 55 60

Arg Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser Pro
65 70 75 80

Cys Arg Gly Cys Glu Gly Thr Cys Ala Gln Arg Phe Val Pro Cys Thr
85 90 95

Arg Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly Phe
100 105 110

Val Arg Asp Ala Glu Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
115 120 125

<210> 22
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 22

Gly Pro Glu Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr Gly
1 5 10 15

```
Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Asn Thr Pro Cys Thr Leu Asn
            20                  25                  30

Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg Arg
        35                  40                  45

Thr Asn Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His Arg
    50                  55                  60

Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser Pro Cys
65                  70                  75                  80

Arg Gly Cys Glu Gly Thr Cys Ala Gln Arg Phe Val Pro Cys Thr Arg
                85                  90                  95

Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly Phe Val
            100                 105                 110

Arg Asp Ala Glu Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
        115                 120                 125
```

<210> 23
<211> 143
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(66)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)..(132)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 23

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Pro Xaa Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr Gly
20 25 30

Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Xaa Thr Pro Cys Thr Leu Asn
35 40 45

Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg Arg
50 55 60

Thr Xaa Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His Arg
65 70 75 80

Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser Pro Cys
85 90 95

Arg Gly Cys Glu Gly Thr Cys Ala Gln Arg Phe Val Pro Cys Thr Arg
100 105 110

Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly Phe Val
115 120 125

Arg Asp Ala Xaa Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
130 135 140

<210> 24
<211> 469
<212> ADN
<213> *Toxocara canis*

<400> 24

atcagcaggt ttcgcttcaa atgcttccga taacttttt gctggcaatt attgtcggtg 60

cagcagtagc tcaccgtaaa tgtggtccaa acgaagagtg gaccgaatgc actggttgcg 120

aaattaagtg cggtcaagga gagcaaccat gccctatgat gtgtcgtccg ccatcgtgtg 180

aatgcatggc cggcaaagga ttacgaagaa cagcggacgg aagatgcgtg ccggaggcac 240

aatgcccaaa aagaatggta aagcgagacg aaaaatgtgg gccaaacgag aaattcctga 300

agtgcagagg ttgtgagggt acctgcaaag aacgtctcgt tccctgccct agaatgtgca 360

aaccaccagg ttgcgaatgc cccgcttcag aaggattcgt tcgcaatgac aaaggcgaat 420

gtatcaagtt cgacgactgc ccgaaataaa ttcaataaat caattttgt 469

<210> 25
<211> 548
<212> ADN
<213> *Toxocara cati*

<400> 25

atcagcaggt ttcgcttcaa atgcttccgt taacttttt gctggcattt attgtgggtg 60

cagcggtagc tcaccgtaaa tgtggtccaa atgaagagtg gacggaatgc actggctgcg 120

aaatgaagtg cggtgaagga gagacaccat gccctatgat gtgtcgtccg ccatcgtgtg 180

aatgcatggc cggcaaagga ttacgaagaa caccggacgg aagatgtgtg ccggaggcac 240

aatgcccgaa acatatggta aagcgagatg aaaaatgtgg gaaaaacgag aaattcctga 300

agtgcagagg atgtgagggt acgtgcaaag aacgtctcgt gccgtgccct aagatgtgca 360

aaccaccagg ttgcgaatgc ccggcttcgg aaggattcgt tcgcaatgac aaacacgaat 420

gtatcaagtt cgacgactgc cccaaataaa ttcaataaat cagtcttgtt gataaataca 480

atcgtgatgc tcacgttttt ttttcttgcc ataaaatcta tacttcccaa aaaaaaaaaa 540

aaaaaaaa 548

<210> 26
<211> 142
<212> PRT
<213> *Toxocara canis*

<400> 26

Met Leu Pro Ile Thr Phe Leu Leu Ala Ile Ile Val Gly Ala Ala Val
1 5 10 15

Ala His Arg Lys Cys Gly Pro Asn Glu Glu Trp Thr Glu Cys Thr Gly
20 25 30

Cys Glu Ile Lys Cys Gly Gln Gly Glu Gln Pro Cys Pro Met Met Cys
35 40 45

Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Met Ala Gly Lys Gly Leu Arg Arg Thr
50 55 60

Ala Asp Gly Arg Cys Val Pro Glu Ala Gln Cys Pro Lys Arg Met Val
65 70 75 80

Lys Arg Asp Glu Lys Cys Gly Pro Asn Glu Lys Phe Leu Lys Cys Arg
85 90 95
Gly Cys Glu Gly Thr Cys Lys Glu Arg Leu Val Pro Cys Pro Arg Met
100 105 110

Cys Lys Pro Pro Gly Cys Glu Cys Pro Ala Ser Glu Gly Phe Val Arg
115 120 125

Asn Asp Lys Gly Glu Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
130 135 140

<210> 27
<211> 142
<212> PRT

<213> *Toxocara cati*

<400> 27

```
Met Leu Pro Leu Thr Phe Leu Leu Ala Phe Ile Val Gly Ala Ala Val
1               5                  10                  15

Ala His Arg Lys Cys Gly Pro Asn Glu Glu Trp Thr Glu Cys Thr Gly
            20                  25                  30

Cys Glu Met Lys Cys Gly Glu Gly Glu Thr Pro Cys Pro Met Met Cys
        35                  40                  45

Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Met Ala Gly Lys Gly Leu Arg Arg Thr
    50                  55                  60

Pro Asp Gly Arg Cys Val Pro Glu Ala Gln Cys Pro Lys His Met Val
65                  70                  75                  80

Lys Arg Asp Glu Lys Cys Gly Lys Asn Glu Lys Phe Leu Lys Cys Arg
                85                  90                  95

Gly Cys Glu Gly Thr Cys Lys Glu Arg Leu Val Pro Cys Pro Lys Met
            100                 105                 110

Cys Lys Pro Pro Gly Cys Glu Cys Pro Ala Ser Glu Gly Phe Val Arg
        115                 120                 125

Asn Asp Lys His Glu Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
    130                 135                 140
```

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 28

```
Met His Arg Lys Cys Gly Pro Asn Glu Glu Trp Thr Glu Cys Thr Gly
1               5                  10                  15

Cys Glu Ile Lys Cys Gly Gln Gly Glu Gln Pro Cys Pro Met Met Cys
            20                  25                  30

Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Met Ala Gly Lys Gly Leu Arg Arg Thr
        35                  40                  45

Ala Asp Gly Arg Cys Val Pro Glu Ala Gln Cys Pro Lys Arg Met Val
    50                  55                  60

Lys Arg Asp Glu Lys Cys Gly Pro Asn Glu Lys Phe Leu Lys Cys Arg
65                  70                  75                  80

Gly Cys Glu Gly Thr Cys Lys Glu Arg Leu Val Pro Cys Pro Arg Met
                85                  90                  95

Cys Lys Pro Pro Gly Cys Glu Cys Pro Ala Ser Glu Gly Phe Val Arg
            100                 105                 110

Asn Asp Lys Gly Glu Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
        115                 120                 125
```

<210> 29
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 29

```
His Arg Lys Cys Gly Pro Asn Glu Glu Trp Thr Glu Cys Thr Gly Cys
1               5                  10                  15

Glu Ile Lys Cys Gly Gln Gly Glu Gln Pro Cys Pro Met Met Cys Arg
            20                  25                  30

Pro Pro Ser Cys Glu Cys Met Ala Gly Lys Gly Leu Arg Arg Thr Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Arg Cys Val Pro Glu Ala Gln Cys Pro Lys Arg Met Val Lys
    50                  55                  60
```

```
Arg Asp Glu Lys Cys Gly Pro Asn Glu Lys Phe Leu Lys Cys Arg Gly
65                  70                  75                  80

Cys Glu Gly Thr Cys Lys Glu Arg Leu Val Pro Cys Pro Arg Met Cys
                85                  90                  95

Lys Pro Pro Gly Cys Glu Cys Pro Ala Ser Glu Gly Phe Val Arg Asn
            100                 105                 110

Asp Lys Gly Glu Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
        115                 120                 125
```

<210> 30
<211> 142
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (88)..(88)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)..(111)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>
<221> misc_feature

<222> (132)..(132)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa His Arg Lys Cys Gly Pro Asn Glu Glu Trp Thr Glu Cys Thr Gly
20 25 30

Cys Glu Xaa Lys Cys Gly Xaa Gly Glu Xaa Pro Cys Pro Met Met Cys
35 40 45

Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Met Ala Gly Lys Gly Leu Arg Arg Thr
50 55 60

Xaa Asp Gly Arg Cys Val Pro Glu Ala Gln Cys Pro Lys Xaa Met Val
65 70 75 80

Lys Arg Asp Glu Lys Cys Gly Xaa Asn Glu Lys Phe Leu Lys Cys Arg
85 90 95

Gly Cys Glu Gly Thr Cys Lys Glu Arg Leu Val Pro Cys Pro Xaa Met
100 105 110

Cys Lys Pro Pro Gly Cys Glu Cys Pro Ala Ser Glu Gly Phe Val Arg
115 120 125

Asn Asp Lys Xaa Glu Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro Lys
130 135 140

<210> 31
<211> 1343
<212> ADN
<213> *Ancylostoma*

<400> 31

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccgaattcga gctcaccact 120

tgtccaggaa atgatctaac agatgctgaa cgcacactgc taactagggt gcacaattcc 180

attcgacggg aaatagcgca aggagttgca aacaactacc atggtggtaa actgcctgct 240

ggaaagaaca tatacaggat gagatacagc tgtgagctgg aacaggctgc tattgatgct 300

agtcaaacct tctgttccgc atcattggag gaaccacaga aatatggaca aaacatccaa 360

gcatacgtca caccatctat aatcgctcgc ccgaaaaacg accttcttga agatgcagtg 420

aaacaatggt atctgcctgt tatctactac ggccaacgcg acgcggccaa caagttcacc 480

gatccgcgct tgtacacatt tgcaaacctc gcctacgaca agaacactgc acttggctgt 540

cactatgcga aatgtcaagg ccctgacaga atcgtcatta gttgcatgta caacaacgtc 600

gttcctgaca acgctgtgat ctacgagcca ggaactgctt gcgtaaaaga tcaggactgc 660

actacttatc ctcagtccac atgcaaggac agcctttgca ttattcctac gccacatcca 720

ccaaatccac caaatccacc acctgcaatg tgtccaaacg ctgaaatgac tgatgcagca 780

cgaaagaagg tcctcgacat gcacaactgg cgcagatcgc agctcgctct gggaaacgtt 840

caaaacggga aaaatgctta caactgcccc actgcaacag acatgtacaa gatggaatat 900

gattgcgacc tcgagaacag cgctctagcg tatgcaaagc aatgtagtct cgttggttca 960

gcagaaggaa ctcgtccagg agaaggcgag aatgtccaca aaggcgctct cgtaaccgat 1020

ccggaggctg cagttcagac cgcagttcaa gcatggtgga gtcaaatctc acaaaatgga 1080

ctcaatgcac agatgaaatt cactgctttc ttgaaggaca agcctgacgc tccgacagcg 1140

tttacacaga tggcgtgggc caaatccgta aagcttggat gtgctgtctc taattgtcag 1200

gcagatacct tcaccgtctg tagatacaaa gctgccggaa acatcgtggg cgaattcatc 1260

tataccaagg gaaatgtatg cgacgcctgt aaagccacat gcattaccgc ggaaggtctt 1320

tgcccaacgc cttgagcggc cgc 1343

<210> 32
<211> 767
<212> ADN
<213> *Ancylostoma*

<400> 32

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccgaattcga gctcaccact 120

tgtccaggaa atgatctaac agatgctgaa cgcacactgc taactagggt gcacaattcc 180

attcgacggg aaatagcgca aggagttgca aacaactacc atggtggtaa actgcctgct 240

ggaaagaaca tatacaggat gagatacagc tgtgagctgg aacaggctgc tattgatgct 300

agtcaaacct tctgttccgc atcattggag gaaccacaga aatatggaca aaacatccaa 360

gcatacgtca caccatctat aatcgctcgc ccgaaaaacg accttcttga agatgcagtg 420

aaacaatggt atctgcctgt tatctactac ggccagcgcg acgcggccaa caagtttacg 480

gatccgcgct tgtacacatt tgcaaacctc gcctacgaca agaacactgc acttggctgt 540

cactatgcga aatgtcaagg ccctgacaga atcgtcatta gttgcatgta caacaacgtc 600

gttcctgaca acgcagtgat ctacgagcct ggaactgctt gcgtaaaaga tgcggactgc 660

actacttatc ctcagtccac atgcaaggac agcctttgca ttattcctac gccacatcca 720

ccaaatccac caaatccacc accagcaatg agtccatgag cggccgc 767

<210> 33
<211> 444
<212> PRT
<213> *Ancylostoma*

<400> 33

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

Gly Ser Glu Phe Glu Leu Thr Thr Cys Pro Gly Asn Asp Leu Thr Asp
35 40 45

Ala Glu Arg Thr Leu Leu Thr Arg Val His Asn Ser Ile Arg Arg Glu
50 55 60

Ile Ala Gln Gly Val Ala Asn Asn Tyr His Gly Gly Lys Leu Pro Ala
65 70 75 80

Gly Lys Asn Ile Tyr Arg Met Arg Tyr Ser Cys Glu Leu Glu Gln Ala
85 90 95

Ala Ile Asp Ala Ser Gln Thr Phe Cys Ser Ala Ser Leu Glu Glu Pro
100 105 110

Gln Lys Tyr Gly Gln Asn Ile Gln Ala Tyr Val Thr Pro Ser Ile Ile
115 120 125

Ala Arg Pro Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ala Val Lys Gln Trp Tyr
130 135 140

Leu Pro Val Ile Tyr Tyr Gly Gln Arg Asp Ala Ala Asn Lys Phe Thr
145 150 155 160

Asp Pro Arg Leu Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Tyr Asp Lys Asn Thr
165 170 175

```
Ala Leu Gly Cys His Tyr Ala Lys Cys Gln Gly Pro Asp Arg Ile Val
            180                 185                 190

Ile Ser Cys Met Tyr Asn Asn Val Val Pro Asp Asn Ala Val Ile Tyr
        195                 200                 205

Glu Pro Gly Thr Ala Cys Val Lys Asp Gln Asp Cys Thr Thr Tyr Pro
    210                 215                 220

Gln Ser Thr Cys Lys Asp Ser Leu Cys Ile Ile Pro Thr Pro His Pro
225                 230                 235                 240

Pro Asn Pro Pro Asn Pro Pro Pro Ala Met Cys Pro Asn Ala Glu Met
                245                 250                 255

Thr Asp Ala Ala Arg Lys Lys Val Leu Asp Met His Asn Trp Arg Arg
            260                 265                 270

Ser Gln Leu Ala Leu Gly Asn Val Gln Asn Gly Lys Asn Ala Tyr Asn
        275                 280                 285

Cys Pro Thr Ala Thr Asp Met Tyr Lys Met Glu Tyr Asp Cys Asp Leu
    290                 295                 300

Glu Asn Ser Ala Leu Ala Tyr Ala Lys Gln Cys Ser Leu Val Gly Ser
305                 310                 315                 320

Ala Glu Gly Thr Arg Pro Gly Glu Gly Glu Asn Val His Lys Gly Ala
                325                 330                 335

Leu Val Thr Asp Pro Glu Ala Ala Val Gln Thr Ala Val Gln Ala Trp
            340                 345                 350

Trp Ser Gln Ile Ser Gln Asn Gly Leu Asn Ala Gln Met Lys Phe Thr
        355                 360                 365

Ala Phe Leu Lys Asp Lys Pro Asp Ala Pro Thr Ala Phe Thr Gln Met
    370                 375                 380

Ala Trp Ala Lys Ser Val Lys Leu Gly Cys Ala Val Ser Asn Cys Gln
385                 390                 395                 400

Ala Asp Thr Phe Thr Val Cys Arg Tyr Lys Ala Ala Gly Asn Ile Val
                405                 410                 415
```

```
Gly Glu Phe Ile Tyr Thr Lys Gly Asn Val Cys Asp Ala Cys Lys Ala
            420                 425                 430

Thr Cys Ile Thr Ala Glu Gly Leu Cys Pro Thr Pro
        435                 440
```

<210> 34
<211> 252
<212> PRT
<213> *Ancylostoma*

<400> 34

```
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1               5                   10                  15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
            20                  25                  30

Gly Ser Glu Phe Glu Leu Thr Thr Cys Pro Gly Asn Asp Leu Thr Asp
        35                  40                  45

Ala Glu Arg Thr Leu Leu Thr Arg Val His Asn Ser Ile Arg Arg Glu
    50                  55                  60

Ile Ala Gln Gly Val Ala Asn Asn Tyr His Gly Gly Lys Leu Pro Ala
65                  70                  75                  80

Gly Lys Asn Ile Tyr Arg Met Arg Tyr Ser Cys Glu Leu Glu Gln Ala
                85                  90                  95

Ala Ile Asp Ala Ser Gln Thr Phe Cys Ser Ala Ser Leu Glu Glu Pro
            100                 105                 110

Gln Lys Tyr Gly Gln Asn Ile Gln Ala Tyr Val Thr Pro Ser Ile Ile
        115                 120                 125

Ala Arg Pro Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ala Val Lys Gln Trp Tyr
    130                 135                 140

Leu Pro Val Ile Tyr Tyr Gly Gln Arg Asp Ala Ala Asn Lys Phe Thr
145                 150                 155                 160

Asp Pro Arg Leu Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Tyr Asp Lys Asn Thr
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys His Tyr Ala Lys Cys Gln Gly Pro Asp Arg Ile Val
```

180 185 190

Ile Ser Cys Met Tyr Asn Asn Val Val Pro Asp Asn Ala Val Ile Tyr
195 200 205

Glu Pro Gly Thr Ala Cys Val Lys Asp Ala Asp Cys Thr Thr Tyr Pro
210 215 220

Gln Ser Thr Cys Lys Asp Ser Leu Cys Ile Ile Pro Thr Pro His Pro
225 230 235 240

Pro Asn Pro Pro Asn Pro Pro Pro Ala Met Ser Pro
245 250

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 35

Arg Phe Val Pro Cys Thr Arg Asn
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 36

Arg Asp Ala Glu Gly Asn Cys Ile Lys Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 37

Met Gly Pro Glu Ser Cys Gly Pro Asn Glu Val Trp Thr Glu Cys Thr
1 5 10 15

Gly Cys Glu Leu Lys Cys Gly Gln Asp Glu Asn Thr Pro Cys Thr Leu
20 25 30

Asn Cys Arg Pro Pro Ser Cys Glu Cys Ser Pro Gly Arg Gly Met Arg
35 40 45

Arg Thr Asn Asp Gly Arg Cys Ile Pro Ala Ser Gln Cys Pro Gln His
50 55 60

<210> 38
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 38

Met Arg Ala Lys Arg Glu Glu Gln Cys Lys Pro Asn Glu Gln Trp Ser
1 5 10 15

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

Thr Arg Asn Cys Arg Pro Pro Gly Cys Glu Cys Val Ala Gly Ala Gly
35 40 45

Phe Val Arg Asp Ala Glu Gly Asn Cys Ile Lys Phe Asp Asp Cys Pro
50 55 60

Lys
65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado en el que el anticuerpo se une específicamente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

2. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se obtiene mediante inmunización con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

3. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo está marcado.

4. Anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo se une específicamente al antígeno de gusano látigo que puede estar presente en una muestra fecal obtenida de un mamífero, y preferiblemente el anticuerpo no se une específicamente a ningún antígeno del uno o más de gusano de gancho o gusano redondo, que pueden estar presentes en la muestra fecal.

5. Anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo está inmovilizado sobre un soporte sólido.

6. Anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o un anticuerpo monoclonal o policlonal.

7. Dispositivo para detectar la presencia o ausencia de antígenos de gusano látigo de una muestra, comprendiendo el dispositivo un soporte sólido, en el que sobre el mismo soporte sólido se ha inmovilizado al menos un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Dispositivo según la reivindicación 7, en el que la muestra es una muestra fecal, preferiblemente la muestra es de un animal canino o un animal felino.

9. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el dispositivo es un dispositivo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, preferiblemente el dispositivo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas es un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral.

10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el dispositivo incluye además uno o más reactivos para la detección de uno o más del grupo que consiste en: uno o más parásitos distintos de gusanos, gusano del corazón, uno o más virus, uno o más hongos y una o más bacterias.

11. Kit para detección de antígenos de gusano látigo en una muestra de mamífero, comprendiendo el kit el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, y uno o más reactivos suficientes para la detección del uno o más antígenos.

12. Kit según la reivindicación 11, en el que el uno o más reactivos se seleccionan del grupo que consiste en uno o más reactivos indicadores, uno o más compuestos de marcaje de anticuerpos, uno o más anticuerpos, uno o más reactivos de captura de antígeno, uno o más inhibidores y uno o más reactivos de lavado.

13. Método para detectar la presencia o ausencia de uno o más antígenos de gusano látigo en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra de un mamífero con uno o más anticuerpos que pueden unirse específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8;

(b) formar complejos anticuerpo-polipéptido en presencia del polipéptido si es que lo hay, en la muestra; y

(c) detectar la presencia o ausencia de los complejos anticuerpo-polipéptido, si es que los hay.

14. Método de diagnóstico de si un mamífero está infectado por un gusano látigo intestinal, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra de un mamífero con uno o más anticuerpos que pueden unirse específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8;

(b) formar complejos anticuerpo-polipéptido en presencia de los polipéptidos, si es que los hay, en la muestra;

(c) detectar la presencia o ausencia de los complejos anticuerpo-polipéptido, si es que los hay; y

(d) diagnosticar al mamífero que tiene gusano látigo si está presente un complejo polipéptido-anticuerpo de gusano látigo.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la muestra es una muestra fecal, preferiblemente la muestra es de un animal canino o un animal felino.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, que comprende además poner en contacto la muestra con uno o más reactivos para detectar uno o más del grupo que consiste en: uno o más parásitos de gusano, uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos y una o más bacterias y en el que el uno o más reactivos son preferiblemente uno o más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para el uno o más parásitos de gusano, uno o más parásitos distintos de gusanos, uno o más virus, uno o más hongos y una o más bacterias.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el uno o más anticuerpos no se unen específicamente a ningún antígeno derivado del grupo que consiste en gusano de gancho o gusano redondo.

18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la etapa de detectar la presencia o ausencia del uno o más complejos incluye además la etapa de proporcionar al menos un anticuerpo secundario que se une al menos a uno de los complejos, preferiblemente el al menos un anticuerpo secundario está marcado.

19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que uno o más del uno o más anticuerpos están marcados.

20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el uno o más anticuerpos están inmovilizados sobre un soporte sólido.

21. Método según la reivindicación 18, en el que el soporte sólido forma parte de un dispositivo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, preferiblemente un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral.

FIG. 1

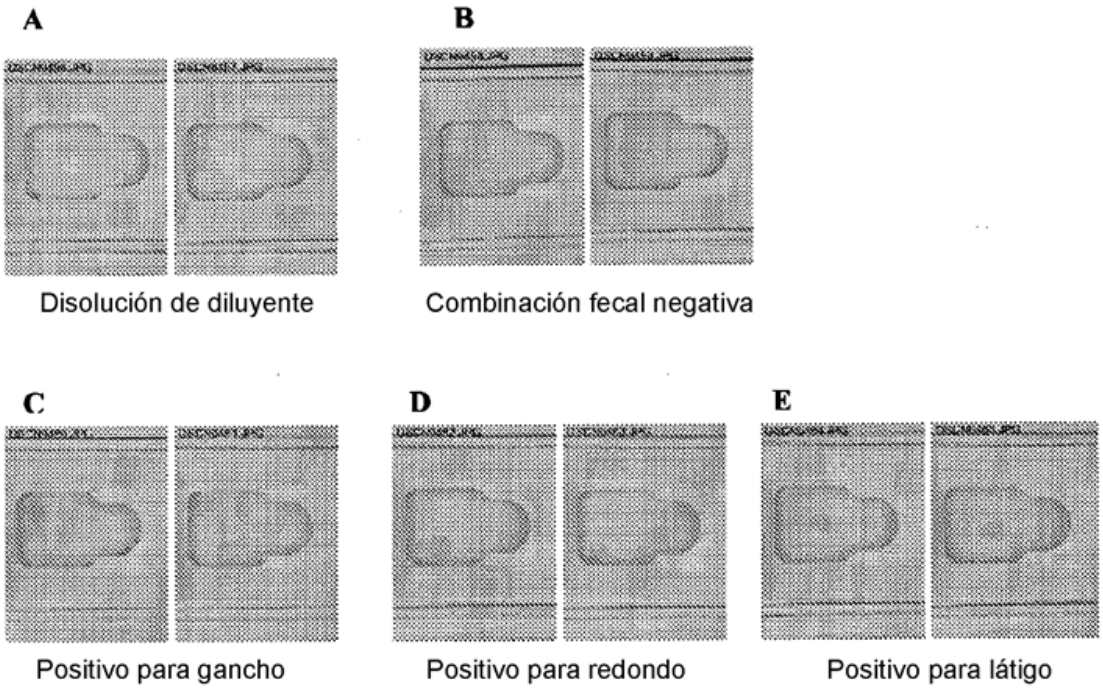
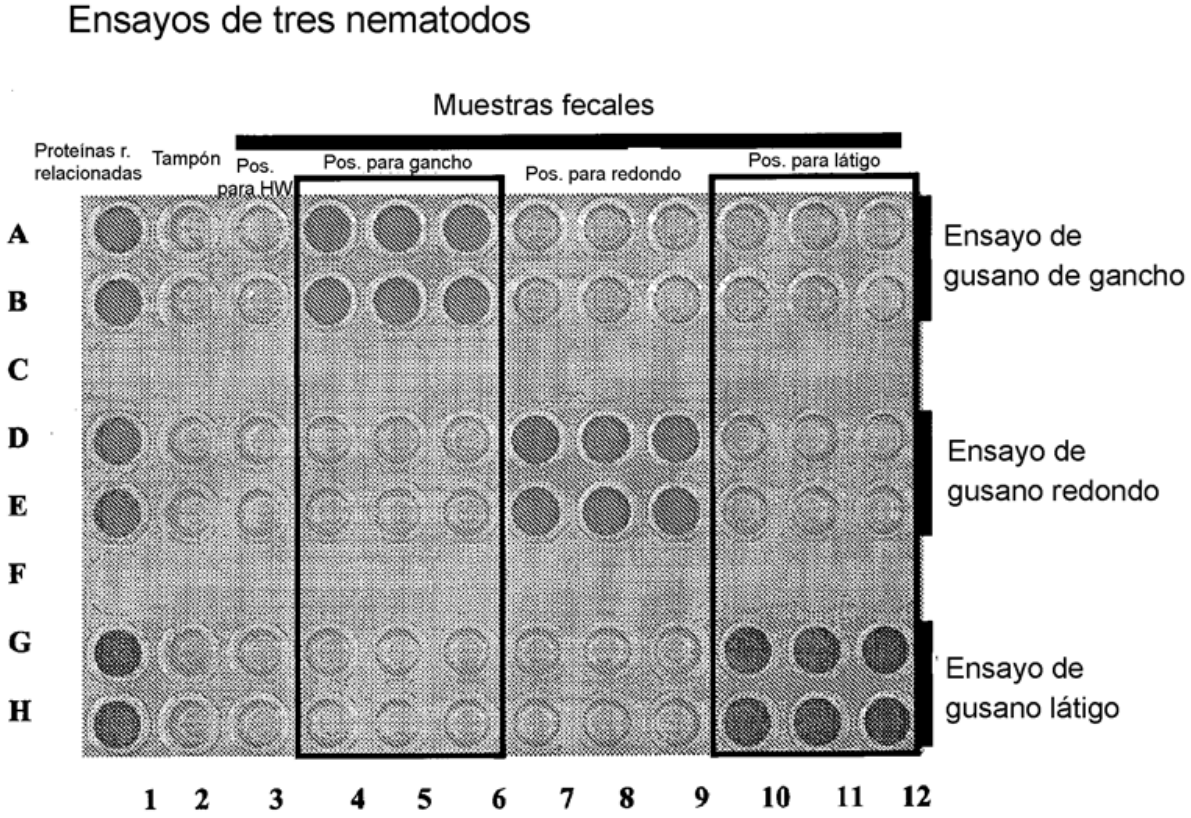

A
Disolución de diluyente
B
Combinación fecal negativa
C
Positivo para gancho
D
Positivo para redondo
E
Positivo para látigo

FIG. 2


Ensayos de tres nematodos
Muestras fecales
Proteínas r. relacionadas
Tampón
Pos. para HW
Pos. para gancho
Pos. para redondo
Pos. para látigo
A
B
C
D
E
F
G
H
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Ensayo de gusano de gancho
Ensayo de gusano redondo
Ensayo de gusano látigo

```
cattcactgc ggttgtaaaa gcagtgcaga aatgaggctg gtcttccatg cggttattta      60
cctcacattg gggttcctca ccgacgccgt aagagaaaaa cgtggcaaat gtcctcctga     120
accaccgatc gcaggaaaca cgatctactg ccgcgatgat tttgattgtg gaggaagaca     180
gaagtgctgt acaattgcag aaggacgtgg atgcgtgccg ccctatggtg aacaacattt     240
cgaagtggtg aaaccgggtc attgcccagc tattccagcg gttacgggca tggcgaactt     300
ctgtaacact gatggcgact gtgatggacc gaaaaaatgt tgtctcacat cgcgcggcta     360
cgattgcaca catccattac acttcccaat ccagccacaa cctccagtag gacagtgccc     420
tccttcaaag ccccgtatcc caggaaaatg ggtagacatc tgcgctaagc atgccaactg     480
cccagaccca gagaagtgtt gcgacacgga gtatggcaac cgatgtatgg atgttggatt     540
agtgccagga caaggagaaa gaccaggcaa ttgcccgaac gaaccacgaa taagaggaac     600
taaatacgat tgccgacgag acgatgactg cgacggtgtg cagaaatgct gcttcactgt     660
tgagggacgt gagtgcgtgg aaccaagtag aaaaccactg gacaagcccg gacattgtcc     720
accaattccc gctgatgtgg gctcagccag gtactgcgac actgatcggg attgtgatgg     780
accaagaaaa tgctgcctct cttcgcgtgg ctatgaatgt aaacatccag tacactatcc     840
cgatcgagtg gagccactag taggagaatg cccaccatca cgacctcgca ttcctgggaa     900
atgggttgac atctgctcta agcatgccaa ctgcccagac ccagagaaat gttgcgacac     960
ggagtatggc aaccgatgta tggacgttgg attagtgcct ggacaaggag aaaaacctgc    1020
caactgccca aaggaaccac gaataagagg aactaagtac gactgtcgac gggacgatga    1080
ctgcgatggg aaacaaaagt gctgctacac aactgaaggc cgcgaatgcg tccatggtat    1140
atggccttaa atggttgctt cttcctataa taaaagcaaa cgaatcaaaa aaaaaaaaaa    1200
aaaaaaaaaa                                                          1210
```

(SEQ TO NO:1)

FIG. 3

```
gtaagagaaa aacgtggcaa atgtcctcctgaaccaccga tcgcaggaaa cacgatctac      60
tgccgcgatg attttgattg tggaggaagacagaagtgct gtacaattgc agaaggacgt     120
ggatgcgtgc cgccctatgg tgaacaagatttcgaagtgg tgaaaccggg tcattgccca     180
gctattccag cggttacggg catggcgaacttctgtaaca ctgatggcga ctgtgatgga     240
ccgaaaaaat gttgtctcac atcgcgcggctacgattgta cacatccgtt acacttccca     300
atccagccac aacctccagt aggacagtgccctccttcaa agccccgtgt tccaggaaaa     360
tgggtagaca tctgcgctaa gcatgccaattgcccagacc cagagaagtg ttgcgacacg     420
gagtatggca accgatgtat ggatgttggattagtggcag gacaaggaga aagaccaggc     480
aattgcccga acgaaccacg aataagaggaactaaatacg attgccgacg agacgatgac     540
tgcgacggtg tgcagaaatg ctgcttcactgttgagggac gtgagtgcgt ggaaccaagc     600
agaaaaccac tggacaagcc cggacattgtccaccaattc ccgctgatgt gggctcagcc     660
aggtactgcg acactgatcg ggattgtgatggaccaagaa aatgctgcct ctcttcgcgt     720
ggctatgaat gtaaacatcc agtacactatcccgatcgag tggagccact agtaggagaa     780
tgcccaccat cacgacctcg cattcctgggaaatgggttg acatctgctc taagcatgcc     840
aactgcccag acccagagaa atgttgcgacacggagtatg gcaaccgatg tatggacgtt     900
ggattagtgc ctggacaagg agaaaaacctgccaactgcc caaaggaacc acgaataagg     960
ggaactaagt acgactgtcg acgggacgatgactgcgatg ggaaacaaaa gtgctgctac    1020
acaactgaag gccgcgaatg cgtccatggtatatggcct                            1059
```

(SEQ ID NO:2)

FIG. 4

```
Consenso (SEQ ID NO: 9) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDEDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQXFEVVKPGHCPA
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                        --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + ---------

(SEQ ID NO: 3) MRLVETAVIYILTLGFLTDAVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDEDCGGRQKCCTIAEGRGCVWYGEQHFEVVKPGHCPA 80
(SEQ ID NO: 4) ---------- VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQDFEVVKPGHCPA 61

Consenso (SEQ ID NO: 9) IPAVTGMANECNIDGDCDGMCCLISRGYDCTHPLHETIOPQPPVGQCPPSKPRXPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTE
                                  90       100       110       120       130       140       150       160
                        --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + ---------

(SEQ ID NO: 3) IPAVIGMANECNIDGDCDGPKKCCLISRGYDCTHPLHETIQPQPPVGQCPPSKPRIPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTE 160
(SEQ ID NO: 4) IPAVIGMANFCNIDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHETIQPQPPVGQCPPSKPRVPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTE 141

Consenso (SEQ ID NO: 9) YGNRCMDVGLVXG¢GERPGNCPNEPRIRGIKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSAR
                                  170       180       190       200       210       220       230       240
                        --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + --------- + ---------

(SEQ ID NO: 3) YGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIRGTKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSAR 240
(SEQ ID NO: 4) YGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGIKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPPIPADVGSAR 221

Consenso (SEQ ID NO: 9) YCDTDRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVG
                                  250       260       270       280       290       300       310       320
                        --------- + --------- + --------- ++ ------ + --------- + --------- + --------- + ---------

(SEQ ID NO: 3) YCDTDRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVG 320
(SEQ ID NO: 4) YCDTDRDCDGPRKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVG 301

Consenso (SEQ ID NO: 9) LVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQKCCYTTEGRECVHGIWP
                                  330       340       350       360       370
                        --------- + --------- + --------- + --------- + ---------

(SEQ ID NO: 3) LVPGQGEKPANCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGKQKCCYTTEGRECVHGIWP 372 (SEQ ID NO: 4)
LVPGQGEKPANCPKEPRIRGIKYDCRRDDDCDGKQKCCYTTEGRECVHGIWP 353
```

FIG. 5

caagaagatt tatggtgtggcagcttcgag acgaaggagg catcacttca cgctcgaaaa 60
cagtctggac acccacctgaaatggcttag ccacgagcaa aaggaggaac tgctgcaaat 120
gaagaaggac ggcaaatcgaagaaggagct ccaggataag atcatgcact attacgagca 180
cctcgaaggc gatgcgaaacatgaagcaac agagcaactg aagggcggat gccgcgagat 240
tcttaagcat gttgttggcgaggagaaagc agctgagatc aaagcactga aagattctgg 300
agcaagcaaa gatgagcttaaagccaaggt cgaagaggca ctccacgcag tcaccgacga 360
agaaaagaag caacatatcgccgaattcgg tcccgcatgc aagaagattt atggtgtggc 420
agcttcgaga cgaaggaggcatcacttcac gctcgaaaac agtctggaca cccacctgaa 480
atggcttagc cacgagcaaaaggaggaact gctgcaaatg aagaaggacg gcaaatcgaa 540
gaaggagctc caggataagatcatgcacta ttacgagcac ctcgaaggga tgctcctcgc 600
gctatgtatc ctgtattgacggccttccaa cctatcacac ctgtcagtgc ggccttacat 660
tcgacgagcg tagaaagacctgtcttccta agcagctggt aaagtactgc ggaatcccag 720
aatctggaga ggcgtcggcggaagttggtg agtcgtacta acacagcacg ctctcgttgg 780
tgcagatgtt gtgtgaaatactttttgtcag ttttccgtgt gttttaaata aataaaaaat 840
tccgtaaaaa aaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 10) 865

FIG. 6

```
atttatggtgtggcagcttcgagacgaaggaggcatcacttcacgctcgaaaaaagtctg      60
gacacccacctgaaatggcttagccacgagcaaaaggaggaactgctgaaaatgaagaaa     120
gatgggaaatcgaagaaggagctccaggataaggtgatgcacttctacgagcacctcgaa     180
ggcgatgcgaaacatgaagcaacagagcaactgaagggcggatgccgcgagatccttaag     240
catgttgttggtgaggagaaagcagctgagatcaaagcactgaaagattctggagcaagc     300
aaagatgagcttaaagccaaggtcgaagatgcactccacgcggtcaccgaagaagaaaag     360
aagcaacatatcgccgaatttggtccagcatgcaaggaaattttcggggtgccggttgat     420
gttcgtcacaaacgcgacccttatactaatatgacgcccgatgaagttgctgaaggacta     480
agaagttaacggtgatcgagctttttgcaaaaactggttgatgcttttaaattcttttaa     540
gccttttttcttgtgttatttcggaattgtaccacacgaacagttagttccgaataaagaa     600
ctgtaattatgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa                                 632
```

(SEQ ID NO: 11)

FIG. 7

```
Consenso (SEQ ID NO: 16) XXXXXXXXXXXXHHFTLEXSLDTHLKWLSHEQKEELLKMKKDGKSKKELQDKXMHXYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILK
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                         ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+
(SEQ ID NO: 14)  -----, MHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQDKIMHYYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILK 70
(SEQ ID NO: 13) IYGVAASRRRRHHFTLEKSLDTHLKWLSHEQKEELLKMKKDGKSKKELQDKVMHFYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILK80

Consenso (SEQ ID NO: 16) HVVGEEKAAEIFALKDSGASKDELKAKVEXALHAVTDEEKKQHIAEFGFACKXIXGVXXXXX XXXXXXXXXX
                                    90        100       110       120       130       140       150       160
                         ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+
(SEQ ID NO:14) HVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEEALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKKIYGVAAS ---------------------------  131
(SEQ ID NO: 13) HVVGEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEDALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKEIFGVPIDVRHKRDPYTHMTPDEVAEGLI60

Consenso (SEQ ID NO:16 XX
                          --
(SEQ ID NO:14) --                                                                                  131
(SEQ ID NO:13) RS                                                                                  162
```

FIG. 8

```
agtcagtagc cactttaatc catcagaatg ctctctgttc ttgcgcttttcgctcttatt      60
acttttgctg tggccggtcc ggaaagctgc ggtccaaacg aagtgtggactgaatgtacc     120
ggttgcgaat tgaaatgtgg gcaagatgaa aatacgccgt gcacactaaactgtcgaccg     180
ccgtcatgtg agtgctctcc aggaagaggc atgagacgaa ccaacgatggaaggtgcatt     240
ccggctagtc agtgcccgca acacagggcc aagagagagg agcaatgcaagccaaatgag     300
cagtggtcac cgtgccgagg atgtgaagga acatgcgcac aaagatttgtcccttgcact     360
agaaactgcc gaccaccagg ctgtgaatgc gttgctggcg caggtttcgtacgtgacgct     420
gaaggaaact gcatcaagtt cgacgattgc ccgaagtaaa taataaccatacaaattgct     480
gattccaatt aaaataataa atgagtccag ctgttaaaaa aaaaaaaaaaaaaaa          535
```

(SEQ ID NO:17)

FIG. 9

```
cagtcagcag ctacttttat ccatcggaat gctctctgtt cttgcgcttttcgctcttat     60
tactttcgct gtggccgatc cgaaaagttg cggtccaaac gaagtgtggactgaatgtac    120
cggttgcgag ttgaaatgcg ggcaggatga ggatacgccg tgcacactaaactgtcggcc    180
gccgtcatgt gagtgctcac caggaagagg catgagacga accgacgatgggaggtgcat    240
tccggctagt cagtgcccgc aacacagagc caagagagag gagcagtgcaagccaaatga    300
gcagtggtca ccgtgccgag gatgtgaagg aacatgcgca caaagatttgtcccttgcac    360
tagaaactgc cgaccaccag gatgtgaatg cgttgctggc gcaggtttcgtacgtgacgc    420
tgcaggaaat tgcatcaagt tcgacgattg cccgaagtaa ataataaccatactaattgc    480
tgattacaat taaaataata aatgagtcca gctgttaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa        536
```

(SEQ ID NO:18)

FIG. 10

```
Consenso (SEQ ID NO: 23) XXXXXXXXXXXXXXXXXPXSCGPNEVWTECTGCELKCGQDEXTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTXDGRCIPASQCPQHR
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                         -------- + ---------- + ----------- + ----------+----------+----------+----------+ ---------- +
          (SEQ ID NO: 21)  ----------- MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTNDGRCIPASQCPQHR  65
          (SEQ ID NO: 20) MLSVLALFALITFAVADPKSCGPNEVWTECTGCELKCGQDEDTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTDDGRCIPASQCPQHR 80

Consenso (SEQ ID N0:23) AKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAXGNCIKFDDCPK
                                  90        100       110       120       130       140
                         -------- + ---------- + ----------- + ----------+----------+ ---------- +
          (SEQ ID NO: 21) AKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK    128
          (SEQ ID NO: 20) AKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAAGNCIKFDDCPK    143
```

FIG 11

atcagcaggt ttcgcttcaa atgcttccga taacttttttgctggcaatt attgtcggtg 60
cagcagtagc tcaccgtaaa tgtggtccaa acgaagagtggaccgaatgc actggttgcg 120
aaattaagtg cggtcaagga gagcaaccat gccctatgatgtgtcgtccg ccatcgtgtg 180
aatgcatggc cggcaaagga ttacgaagaa cagcggacggaagatgcgtg ccggaggcac 240
aatgcccaaa aagaatggta aagcgagacg aaaaatgtggccaaacgag aaattcctga 300
agtgcagagg ttgtgagggt acctgcaaag aacgtctcgttccctgccct agaatgtgca 360
aaccaccagg ttgcgaatgc cccgcttcag aaggattcgttcgcaatgac aaaggcgaat 420
gtatcaagtt cgacgactgc ccgaaataaa ttcaataaatcaattttgt (SEQ ID NO: 24) 469

FIG. 12

```
atcagcaggt  ttcgcttcaa atgcttccgt taacttttt gctggcattt attgtgggtg      60
cagcggtagc  tcaccgtaaa tgtggtccaa atgaagagtg gacggaatgc actggctgcg     120
aaatgaagtg  cggtgaagga gagacaccat gccctatgat gtgtcgtccg ccatcgtgtg     180
aatgcatggc  cggcaaagga ttacgaagaa caccggacgg aagatgtgtg ccggaggcac     240
aatgcccgaa  acatatggta aagcgagatg aaaaatgtgg gaaaaacgag aaattcctga     300
agtgcagagg  atgtgagggt acgtgcaaag aacgtctcgt gccgtgccct aagatgtgca     360
aaccaccagg  ttgcgaatgc ccggcttcgg aaggattcgt tcgcaatgac aaacacgaat     420
gtatcaagtt  cgacgactgc cccaaataaa ttcaataaat cagtcttgtt gataaataca     480
atcgtgatgc  tcacgttttt ttttcttgcc ataaaatcta tacttcccaa aaaaaaaaaa     540
aaaaaaaa       (SEQ ID                                                 548
               NO: 25)
```

FIG. 13

```
Consenso (SEQ ID NO: 30)XXXXXXXXXXXXXXXXXHRKCGPNEEWTECTGCEXKCGXGEXPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRIXDGRCVPEAQCPKXMV
                               10       20        30       40       50       60       70       80
                         --------+--------+•------+ -------+--------+ -------+ -------+--------+
. (SEQ ID NO:28)   ------------MERKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGEQPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRTADGRCVPEAQCPKRMV    64
(SEQ ID.N0:27) MLPLIFLIAFIVGAAVAHRKCOPNEEWTECTGCEMKCGEGETPCPMMCRPPSCECMAGKOLARTPDGRCVPEAQCPKHMV    80

Consenso (SEQ ID NO: 30)
KRDEKCGXNEKFLKCRGCEGICKERLVPCPXMCKPPGCECPASEGFVRNDKXECIKFDDCPK
                               90       100       110      120      130      140
                    ------------------+---------+---------+ -------+---------+---------+-
(SEQ ID NO: 28) KRDEKCGPNEKELKCRGCEGTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFVRNDKGECIKEDDCPK    126
(SEQ ID NO: 27) KRDEKCGKNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPKMCKPPGCECPASEGFVRNDKHECIKFDDCPK    142
```

FIG. 14

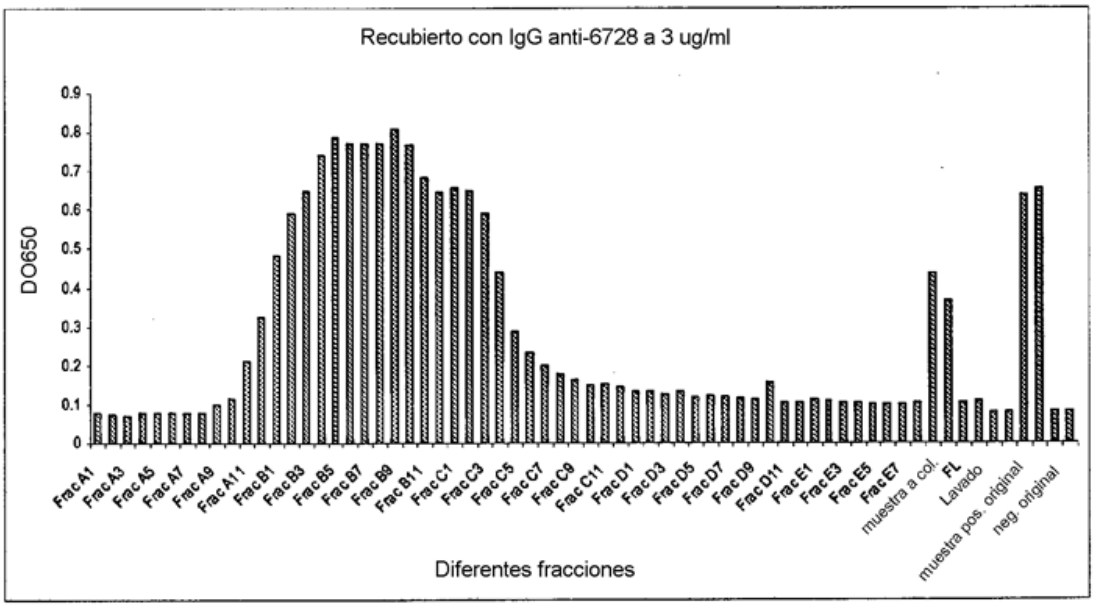

Recubierto con IgG anti-6728 a 3 ug/ml
DO650
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Frac A1
Frac A3
Frac A5
Frac A7
Frac A9
Frac A11
Frac B1
Frac B3
Frac B5
Frac B7
Frac B9
Frac B11
Frac C1
Frac C3
Frac C5
Frac C7
Frac C9
Frac C11
Frac D1
Frac D3
Frac D5
Frac D7
Frac D9
Frac D11
Frac E1
Frac E3
Frac E5
Frac E7
muestra a col.
FL
Lavado
muestra pos. original
neg. original
Diferentes fracciones

FIG. 15

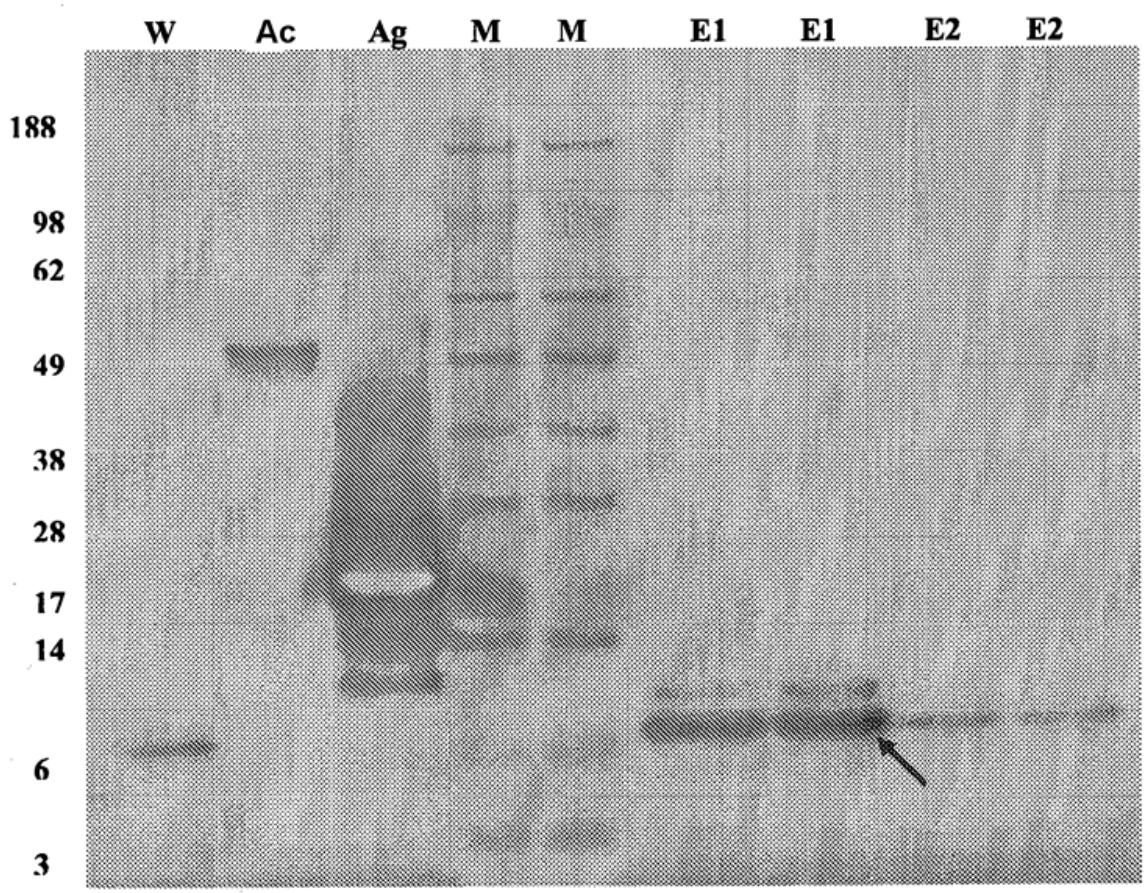


FIG. 16

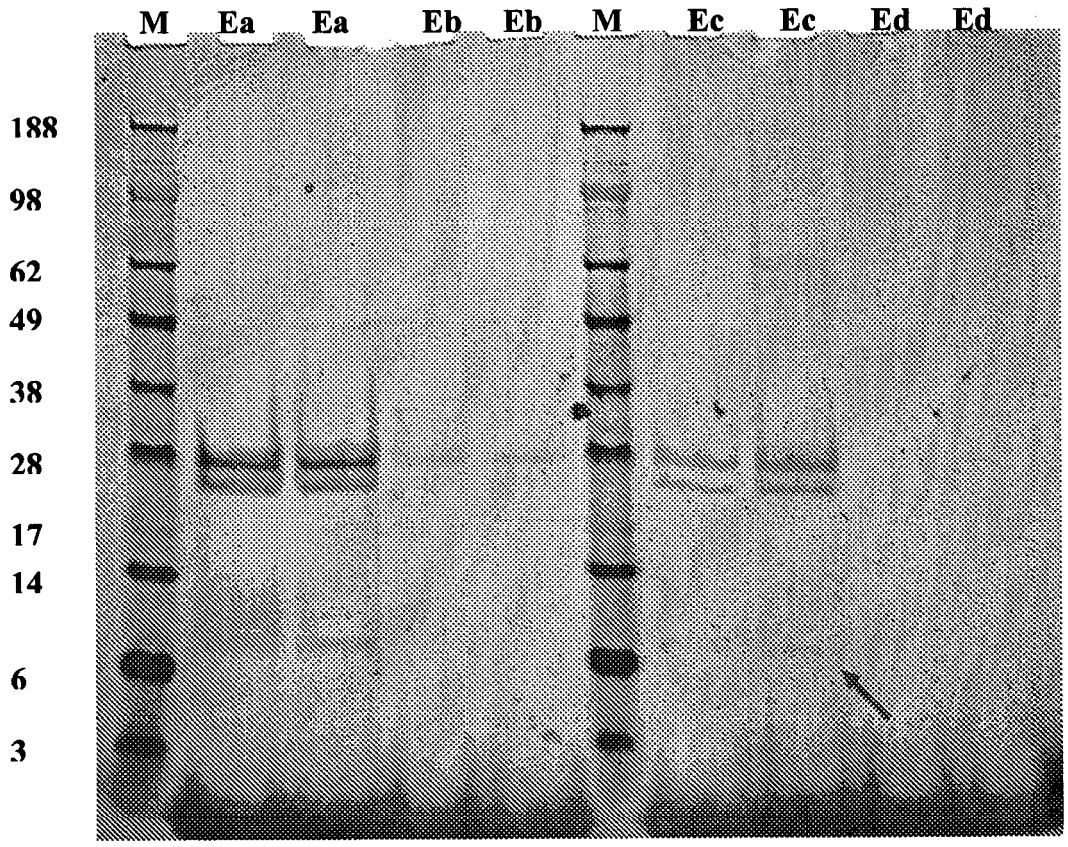


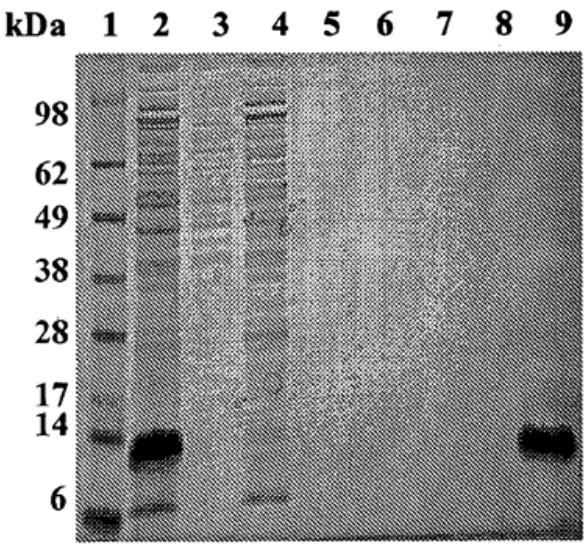
FIG. 17

MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTNDGRCIPASQCP
QHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIK
FDDCPK (SEQ ID NO: 21)

FIG. 18

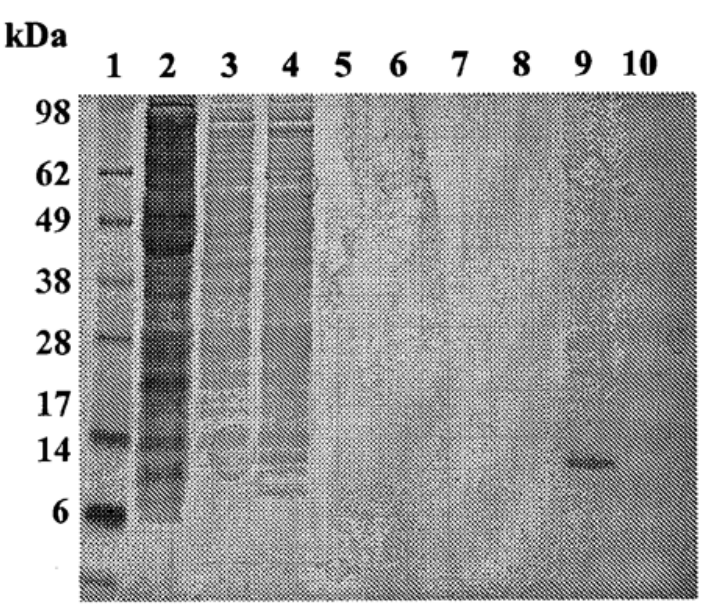
```
6728N   MGP---ESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRTNDGRCIPASQCPQH 64 (SEQ ID NO: 37)
6728C   MRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQR-FVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK- 65 (SEQ ID NO: 38)
          *  .  *.* *** *: * *** .*.*   .*** ***** .* *: *  :*.**  .:**:
```

FIG. 19



carril	
1	marcador
2	carga (lavado)
3	vacío n.º 2
4	lavado n.º 2
5	20 nM n.º 2
6	40 nM n.º 2a
7	40 nM n.º 2b
8	80 nM n.º 2
9	500 nM n.º 2

FIG. 20



carril	
1	marcador
2	carga (lavado)
3	vacío n.º 2
4	lavado n.º 2
5	20 nM n.º 2
6	40 nM n.º 2a
7	40 nM n.º 2b
8	80 nM n.º 2
9	500 nM n.º 2a
10	500 nM n.º 2b

FIG. 21

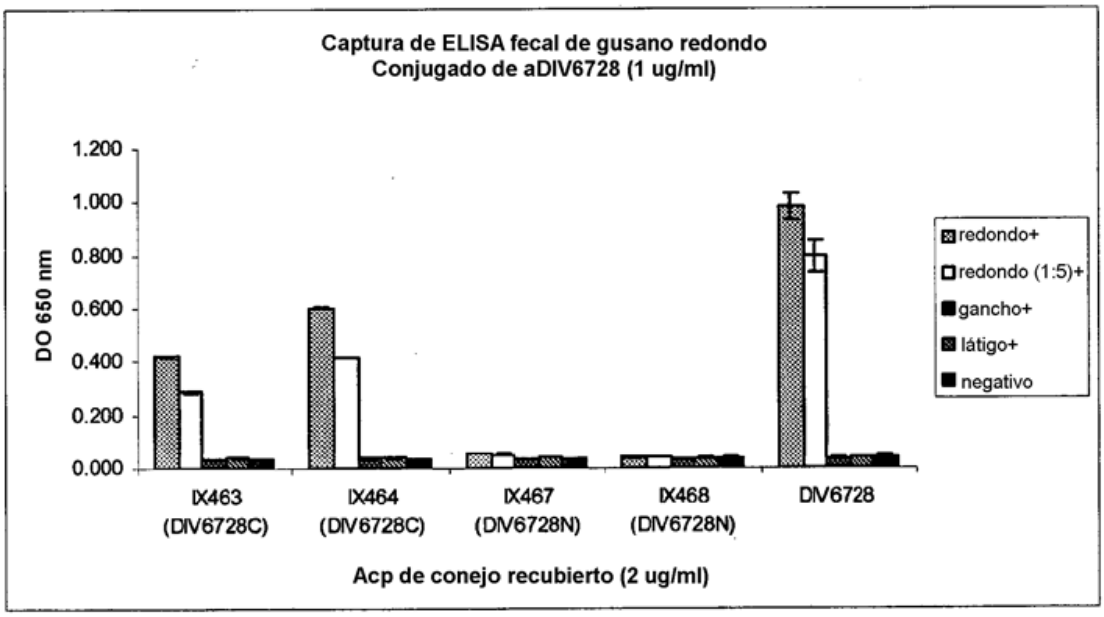

Captura de ELISA fecal de gusano redondo
Conjugado de aDIV6728 (1 ug/ml)
DO 650 nm
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
redondo+
redondo (1:5)+
gancho+
látigo+
negativo
IX463 (DIV6728C)
IX464 (DIV6728C)
IX467 (DIV6728N)
IX468 (DIV6728N)
DIV6728
Acp de conejo recubierto (2 ug/ml)

FIG. 22

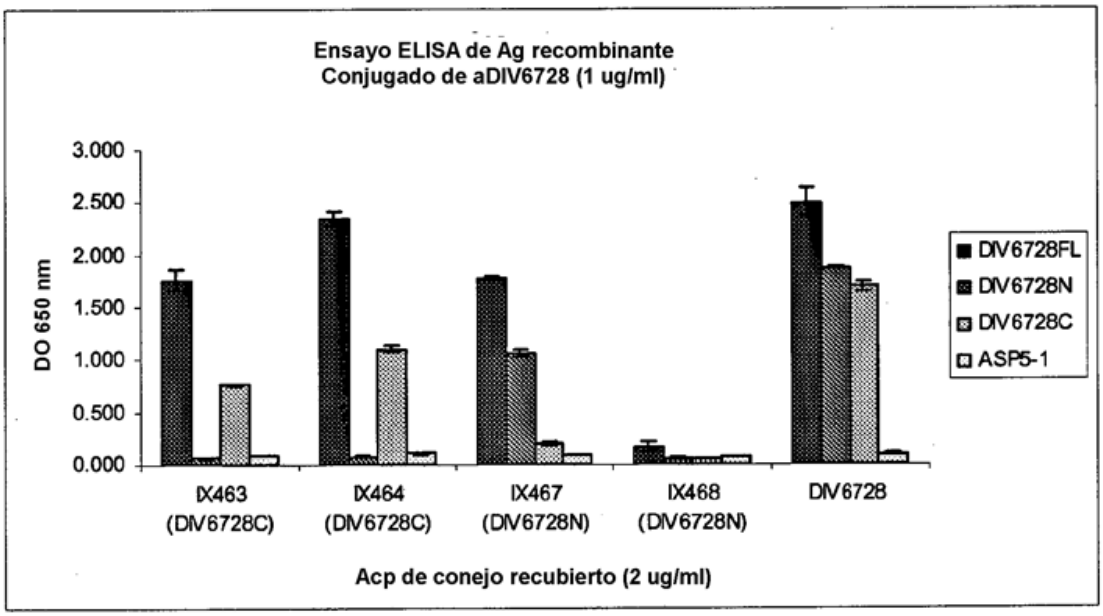

Ensayo ELISA de Ag recombinante
Conjugado de aDIV6728 (1 ug/ml)
DO 650 nm
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
IX463 (DIV6728C)
IX464 (DIV6728C)
IX467 (DIV6728N)
IX468 (DIV6728N)
DIV6728
Acp de conejo recubierto (2 ug/ml)
DIV6728FL
DIV6728N
DIV6728C
ASP5-1

FIG. 23

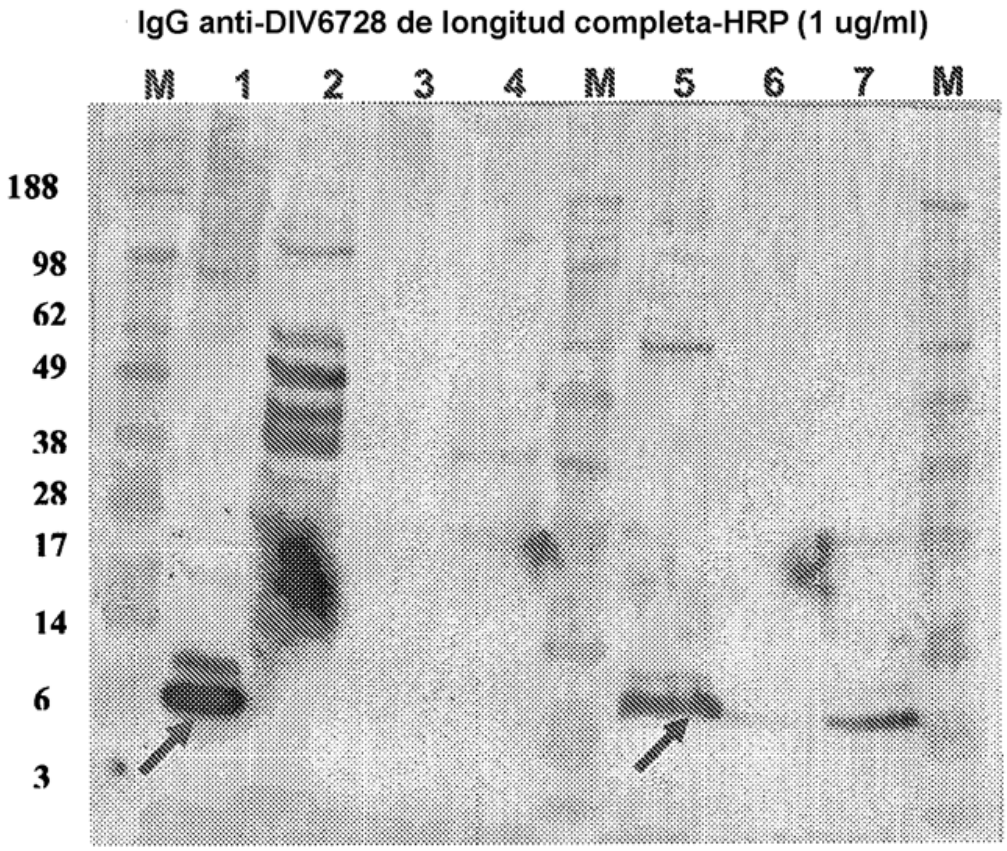

IgG anti-DIV6728 de longitud completa-HRP (1 ug/ml)
M 1 2 3 4 M 5 6 7 M
188
98
62
49
38
28
17
14
6
3

FIG. 24

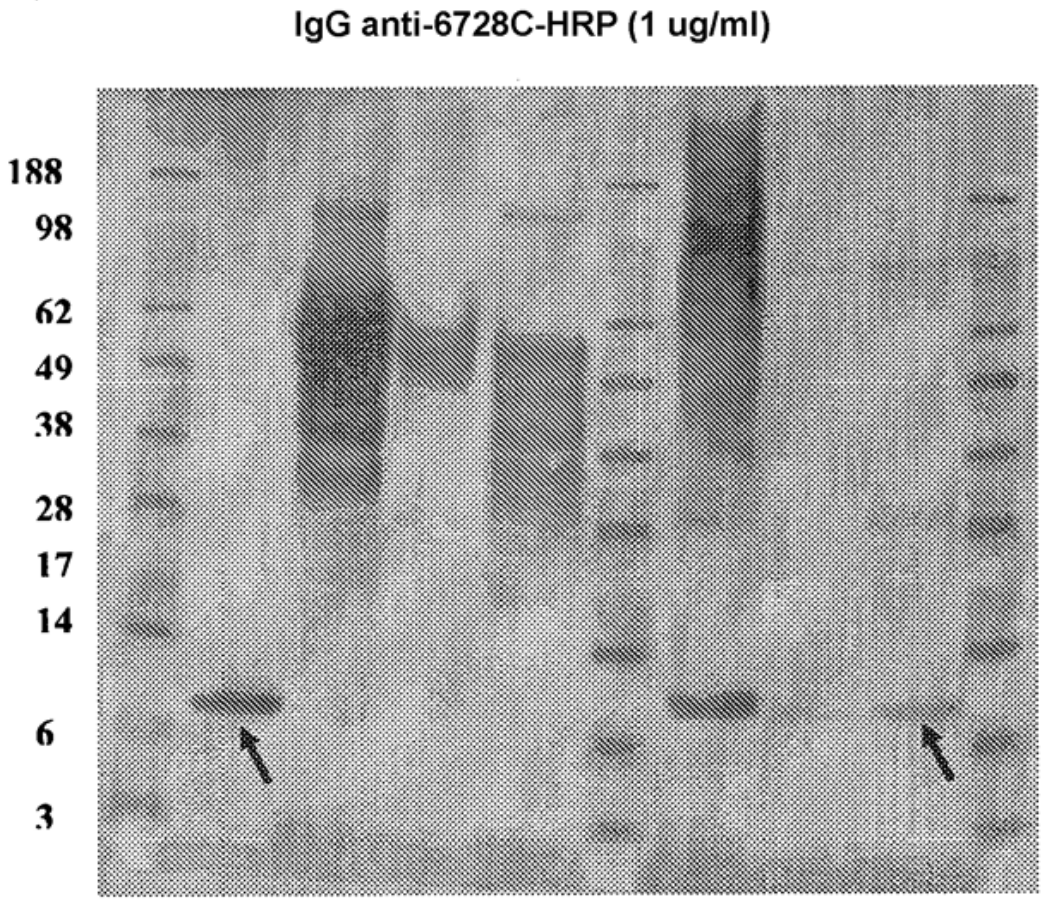


FIG. 25

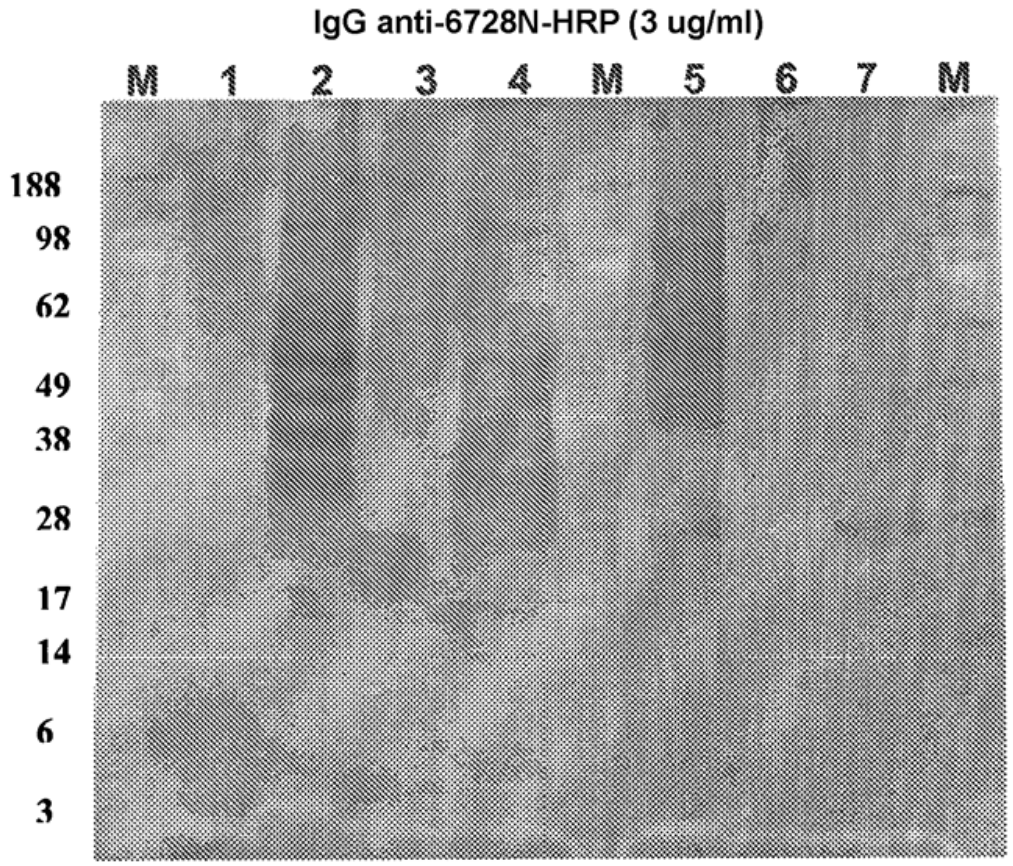


FIG. 26