



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0912864-6 B1

(22) Data do Depósito: 18/05/2009

(45) Data de Concessão: 25/06/2024

(54) Título: MÉTODOS, DISPOSITIVOS, KITS E COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR ASCARÍDEOS, TRICURÍDEOS E ANCILOSTOMÍDEOS

(51) Int.Cl.: G01N 33/53; G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2008 US 61/122,254; 12/12/2008 US 61/122,260; 19/05/2008 US 61/128,079; 19/05/2008 US 61/128,076; 19/05/2008 US 61/128,099; (...).

(73) Titular(es): MONSANTO COMPANY; IDEXX LABORATORIES, INC..

(72) Inventor(es): DAVID ALLEN ELSEMORE; JINMING GENG; LAURIE A. FLYNN; MICHAEL CRAWFORD.

(86) Pedido PCT: PCT US2009044405 de 18/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/143083 de 26/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/11/2010

(57) Resumo: MÉTODOS, DISPOSITIVOS, KITS E COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR ASCARÍDEOS, TRICURÍDEOS E ANCILOSTOMÍDEOS. A presente invenção refere-se aos métodos, dispositivos, kits e composições para detectar a presença ou a ausência de um ou mais coproantígenos de helminto em uma amostra. Os métodos, dispositivos, kits e composições da presente invenção podem ser usados para confirmar a presença ou a ausência de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo em uma amostra de fezes de um mamífero e podem também ser capazes de distinguir entre uma ou mais infecções por helmintos. A confirmação da presença ou da ausência de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo no mamífero pode ser feita, por exemplo, com a finalidade de selecionar um curso ideal de tratamento dos mamíferos e/ou com a finalidade de determinar se o mamífero não apresenta mais a infecção após o tratamento ter sido iniciado.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS, DISPOSITIVOS E KITS PARA DETECTAR
ASCARÍDEOS, TRICURÍDEOS E ANCILOSTOMÍDEOS".**

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] Este pedido de patente reivindica prioridade aos Pedidos de Patente Provisórios U.S. Nº de Série 61/122.260, depositado em 12 de dezembro de 2008; 61/128.077, depositado em 19 de maio de 2008; 61/128.079, depositado em 19 de maio de 2008; 61/128.076, depositado em 19 de maio de 2008; 61/128.099, depositado em 19 de maio de 2008; e 61/122.254, depositado em 12 de dezembro de 2008; e aos Pedidos de Patente U.S. Nº de Série 11/763.592, depositado em 15 de junho de 2007 e 11/763.583, depositado em 15 de junho de 2007, que são incorporados aqui por referência na sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. CAMPO DA INVENÇÃO:

[002] A presente invenção refere-se a composições, dispositivos, kits e métodos para detectar e distinguir os nematoides, os tricurídeos e os ancilostomídeos em mamíferos. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a anticorpos e composições, dispositivos, kits e métodos de anticorpos para detectar a presença ou a ausência do antígeno de nematoide, do antígeno de tricurídeo e do antígeno de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero e para distinguir entre os antígenos de nematoide, de tricurídeo e de ancilostomídeo.

2. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA ANTERIOR:

[003] As infecções por vermes parasitas (helmintos) são comuns em animais e, se não forem diagnosticadas e tratadas, podem causar doenças graves ou morte. Os métodos atuais para diagnosticar as infecções por vermes parasitas envolvem, principalmente, a examinação microscópica das amostras de fezes, tanto diretamente, em esfregaços de fezes quanto seguindo a concentração de óvulos e

parasitas por flotação em densidade média. Apesar da alta aprovação deste procedimento, o método possui imperfeições significantes. Estes métodos microscópicos são demorados e exigem equipamentos especializados. Além disso, a precisão dos resultados desses métodos é altamente dependente da habilidade e experiência do operador. Por exemplo, a presença dos tricurídeos é determinada pela procura de ovos, mas estes são eliminados de forma intermitente e em pequenas quantidades. Os ancilostomídeos são difíceis para o profissional médio detectar, tanto no início da infecção quanto em animais jovens. A especificidade do diagnóstico de nematoides através da examinação microscópica é de aproximadamente 50%.

[004] O manuseamento das fezes é desagradável e perigoso. Procedimentos inofensivos e higiênicos para o processamento das fezes são difíceis e, geralmente, complexos. Tais processos podem incluir a pesagem, a centrifugação e o armazenamento, e são difíceis, exceto em um laboratório de análise clínica equipado com aparelhos adequados, equipamentos de proteção e um técnico versado. Portanto, é desejável qualquer redução no número das etapas necessárias para realizar um teste de fezes e qualquer redução de contato entre o operador do teste e o material de teste. Os laboratórios de análise clínica tem utilizado os métodos de imunoensaio para a detecção de vários vírus, bactérias e parasitas não helmintos e organismos nas fezes. No entanto, há ainda a necessidade de um método de imunoensaio simples para a detecção de infecções por vermes parasitas em fezes, sangue total ou soro.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um dispositivo para, especificamente, ligar e isolar os antígenos de helmintos de uma amostra, por exemplo, os coproantígenos de uma amostra de fezes, o dispositivo compreendendo um suporte sólido, em

que o suporte sólido imobilizou nele pelo menos dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em (a) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo (b) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo; e (c) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou ascarídeo. O dispositivo pode ser, mas não se limita a ser, por exemplo, um dispositivo de ELISA, tal como um dispositivo de imunoensaio de fluxo lateral ou um dispositivo de placa de microtítulo. As amostras que podem ser testadas pelo dispositivo para ascarídeo, tricurídeo e ancilostomídeo incluem, mas não são limitadas a serem, fezes, mucosas do aparelho digestivo, urina, sangue total, soro, leite materno e tecido total, tais como, por exemplo, tecido da glândula mamária, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, músculo e olho. O dispositivo pode incluir ainda, mas não precisa incluir, um ou mais reagentes para a detecção de um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

[006] Em um outro aspecto ainda, a invenção refere-se a um método para detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de helmintos em uma amostra, por exemplo, coproantígenos a partir de uma amostra de fezes, o método compreendendo: (a) contatar uma amostra a partir de um mamífero com pelo menos dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em: (i) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo; (ii) um segundo anticorpo capaz de ligar,

especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo; e (iii) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ascarídeo; (b) formar os complexos coproantígeno-anticorpo na presença dos coproantígenos, se houver, na amostra; e (c) detectar a presença ou a ausência dos complexos de coproantígenos do anticorpo, se houver. Um ou mais coproantígenos de helmintos incluem, por exemplo, coproantígenos de ascarídeo, tais como *Toxocara canis* (*T. canis*), *Toxocara cati* (*T. cati*), *Toxocara vitulorum* (*vitulorum T.*), *Toxascaris leonina* (*T. leonina*), *procyonis Baylisascaris* (*B. procyonis*), *Ascaridia galli* (*A. galli*), *Parascaris equorum* (*P. equorum*), *Ascaris suum* (*A. suum*), ou *Ascaris lumbricoides* (*Ascaris lumbricoides*), *Anisakis simplex* (*A. simplex*), ou *decipiens Pseudoterranova* (*P. decipiens*), de tricurídeo, tais como *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris discolor* e de ancilostomídeo, tais como *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *ceylanicum Ancylostoma*, *Ancylostoma tubaeforme* e *pluridentatum Ancylostoma*, *Necator americanus*, e *Uncinaria stenocephala*, em uma amostra obtida de um mamífero, tais como um canino, felino, bovino, suíno ou ser humano e distinguir entre ascarídeo, tricurídeo e ancilostomídeo. Em um aspecto, o método é realizado para testar uma amostra de fezes de mamíferos para coproantígeno de ascarídeo, coproantígeno de tricurídeo e coproantígeno de ancilostomídeo. O método, no entanto, não se limita a ser realizado para testar uma amostra de fezes. Além disso, as fezes, a amostra, no entanto, podem ser, mas não estão limitadas a serem, de sangue total, soro, leite materno e tecido total, tais como, por exemplo, o tecido da glândula mamária, intestino, fígado, coração,

pulmão, esôfago, cérebro, músculo e olho.

[007] Em um outro aspecto ainda, a invenção refere-se a um método para diagnosticar se um mamífero está infectado por um ou mais vermes parasitas, o método compreendendo as etapas de: (a) contatar uma amostra de um mamífero com pelo menos dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em: (i) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo; (ii) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo; e (iii) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígenos de tricurídeo ou de ascarídeo (b) formar os complexos coproantígenos-anticorpo na presença do coproantígeno, se houver, na amostra, (c) detectar a presença ou a ausência dos complexos coproantígenos-anticorpo, se houver; e (d) diagnosticar o mamífero como possuindo: (i) uma infecção por ascarídeo, se um complexo coproantígeno-anticorpo de ascarídeo estiver presente, (ii) uma infecção por tricurídeo, se um complexo coproantígeno-anticorpo do tricurídeo estiver presente; e (iii) uma infecção por ancilostomídeo, se um complexo coproantígeno-anticorpo de ancilostomídeo estiver presente. O método também pode ser usado para testar e distinguir entre a contaminação ambiental com ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo. As amostras ambientais que podem ser testadas pelo dispositivo para ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo inclui, mas não estão limitadas ao solo, à decomposição material, ou ao material das fezes a partir de ambientes residenciais, incluindo pátios, jardins, caixas de areia, playgrounds. Os locais de teste podem também incluir parques, praias, matas, fazendas ou outros locais expostos ao material das fezes a partir de cães, gatos

ou outros mamíferos hospedeiros de ascarídeo. As fezes de sacos de lixo da rua e de dentro de casa podem ser testadas também.

[008] Em um outro aspecto ainda, a presente invenção inclui um kit para a realização de uma ou mais etapas do método da invenção. O kit pode opcionalmente incluir, por exemplo, o dispositivo e uma ou mais das composições da presente invenção e instruções para realizar o método da presente invenção. O kit pode ainda, opcionalmente, incluir, por exemplo, um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos marcados de anticorpos, um ou mais anticorpos, um ou mais reagentes de captura de antígeno, um ou mais inibidores e um ou mais reagentes de lavagem a serem utilizados como parte do dispositivo e/ou a serem utilizados na realização do método.

[009] Em um outro aspecto ainda, a presente invenção inclui um dispositivo que liga, especificamente, antígenos de helmintos de uma amostra, por exemplo, coproantígenos de uma amostra de fezes, o dispositivo compreendendo um suporte sólido, em que o suporte sólido possui imobilizado nele, pelo menos, dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em: (a) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo; (b) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo; e (c) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou ascarídeo; e (d) um ou mais tipos de antígeno de ascarídeo, antígeno de tricurídeo, e/ou antígeno de ancilostomídeo, em que um ou mais tipos do antígeno de ascarídeo, antígeno de tricurídeo e antígeno de ancilostomídeo são ligados, especificamente, aos anticorpos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0010] A figura 1 mostra os resultados de um ensaio ELISA, que foi realizado usando um dispositivo de fluxo lateral e que as amostras de fezes foram testadas a partir de caninos infectados por ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo, seguindo o método da presente invenção em um primeiro exemplo.

[0011] A figura 2 mostra os resultados de um ensaio ELISA, que foi realizado através de uma placa de microtítulo e que as amostras de fezes foram testadas a partir de caninos infectados tanto por ascarídeo, ancilostomídeo, tricurídeo quanto por dirafilariose, seguindo o método da presente invenção em um segundo exemplo

[0012] A figura 3 mostra a sequência de nucleotídeos de uma sequência cDNA de 1210 nucleotídeos de *Trichuris vulpis* adulto completo (SEQ ID NO: 1).

[0013] A figura 4 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 1059 nucleotídeos de *Trichuris vulpis* adulto completo. (SEQ ID NO: 2).

[0014] A figura 5 mostra um alinhamento de comparação de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4. A sequência de consenso de SEQ ID NO 3 e SEQ ID NO: 4 é mostrada como SEQ ID NO: 9.

[0015] A figura 6 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 865 nucleotídeo de *Toxocara canis* adulto completo. (SEQ ID NO: 10).

[0016] A figura 7 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 632 nucleotídeo de *Toxocara cati* adulto completo. (SEQ ID NO: 11).

[0017] A figura 8 mostra um alinhamento de comparação de SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14. A sequência de consenso de SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14 é mostrada como SEQ ID NO: 16.

[0018] A figura 9 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 535 nucleotídeo de *Toxocara canis* adulto

completo. (SEQ ID NO: 17).

[0019] A figura 10 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 536 nucleotídeo de *Toxocara cati* adulto completo. (SEQ ID NO: 18).

[0020] A figura 11 mostra um alinhamento de comparação de SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21. A sequência de consenso de SEQ ID NO: 20 e SEQ ID NO: 21 é mostrada como SEQ ID NO: 23.

[0021] A figura 12 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 469 nucleotídeos de *Toxocara canis* adulto completo. (SEQ ID NO: 24).

[0022] A figura 13 mostra a sequência de nucleotídeo de uma sequência cDNA de 548 nucleotídeos de *Toxocara cati* adulto completo. (SEQ ID NO: 25).

[0023] A figura 14 mostra um alinhamento de comparação de SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 28. A sequência de consenso de SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 28 é mostrada como SEQ ID NO: 30.

[0024] A figura 15 mostra um teste ELISA com frações de eluição a partir das colunas de SP como amostras e que Copro6728 pode ser parcialmente purificada e enriquecida através da eluição da coluna de SP, seguindo o método da presente invenção no terceiro exemplo.

[0025] A figura 16 mostra que o peso molecular de Copro6728 foi de cerca de 7KD utilizando um Western Blot sondado com Coelho do comprimento total de IgG-HRP anti-DIV6728, seguindo o método da presente invenção no terceiro exemplo.

[0026] A figura 17 mostra que o peso molecular de Copro6728 foi de cerca de 7KD utilizando um gel SDS-PAGE manchado com a Coloração de Proteínas Imperial, seguindo o método da presente invenção no terceiro exemplo.

[0027] A figura 18 mostra a sequência de aminoácidos de comprimento total DIV6728 (SEQ ID NO: 21), com os dois peptídeos

(SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36) identificados pela análise de Espectrometria de Massa identificada pelo realce dos mesmos nas caixas sombreadas, seguindo o método da invenção presente no terceiro exemplo.

[0028] A figura 19 mostra um alinhamento das sequências de aminoácido 6728N (SEQ ID NO: 37) e 6728C (SEQ ID NO: 38) codificadas pelos construtos, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0029] A figura 20 mostra um gel de SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação da 6728N recombinante, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0030] A figura 21 mostra um gel de SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação da 6728C recombinante, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0031] A figura 22 mostra os dados obtidos através do teste ELISA com diferentes amostras de fezes para testar os diferentes anticorpos policlonais contra diferentes proteínas 6728 recombinantes, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0032] A figura 23 mostra os dados obtidos através do teste ELISA com proteínas recombinantes para testar os diferentes anticorpos policlonais contra diferentes proteínas 6728 recombinantes, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0033] A figura 24 mostra o Western blotting com diferentes amostras de fezes sondadas com o coelho do comprimento total de IgG-HRP anti-DIV6728, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0034] A figura 25 mostra o Western blotting com diferentes amostras de fezes sondadas com o coelho de IgG-HRP anti-6728C,

seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0035] A figura 26 mostra o Western blotting com diferentes amostras de fezes sondadas com o coelho de IgG-HRP anti-6728N, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS DA INVENÇÃO

I. INTRODUÇÃO

[0036] A presente invenção refere-se, geralmente, a métodos, dispositivos e kits para detectar e distinguir entre o ascarídeo, o tricurídeo e o ancilostomídeo em uma amostra de fezes obtida de um mamífero. A presente invenção refere-se aos coproantígenos de ascarídeo de *Toxocara*, tal como *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, aos coproantígenos de tricurídeo de *Trichuris*, tal como *Trichuris vulpis* e aos coproantígenos de ancilostomídeo de *Ancylostoma*, tal como *caninum Ancylostoma*, por exemplo. Em particular, a presente invenção refere-se aos métodos, dispositivos e kits para detectar e distinguir entre o nematoídeo, tal como *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris*, *Ascaris*, *Anisakis*, ou *Pseudoterranova*, incluindo *T. canis*, *T. cati*, *T. vitulorum*, *T. leonina*, *T. vitulorum*, *B. procyonis*, *A. galli*, *P. equorum*, *A. lumbricoides* e *A. suum*, *A. simplex*, e *P. simplex*, e *P. decipiens*, o tricurídeo, tais como *Trichuris vulpis*, *Trichuris serrata*, *T. campanula* e *Trichuris trichiura*, e o ancilostomídeo, tais como *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *ceylanicum Ancylostoma*, *Ancylostoma tubaeforme* e *pluridentatum Ancylostoma*, *Necator americanus*, e *Uncinaria stenocephala*, por exemplo.

[0037] A presente invenção fornece uma alternativa superior às atuais técnicas de inspeção microscópica. É bem verdade que a presente invenção fornece dispositivos, kits e métodos para detectar a presença ou a ausência de ascarídeo, de tricurídeo e de

ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero ao qual: (1) ambos são de fácil utilização e proporciona resultados consistentemente confiáveis; (2) permite a ausência ou a presença de tricurídeo em um mamífero a ser confirmado, não importado se o mamífero está infectado por ancilostomídeo, ascarídeo e/ou dirofilariose, (3) capaz de detectar o ascarídeo, o tricurídeo e o ancilostomídeo antes que os óvulos apareçam pela primeira vez nas fezes do hospedeiro infectado, e (4) capaz de distinguir entre as infecções por ascarídeo, tricurídeo e ancilostomídeo.

[0038] A presente invenção é baseada em parte na descoberta de propriedades inesperadas de composições específicas para as infecções por ascarídeo, tricurídeo e ancilostomídeo. Especificamente, determinou-se que os anticorpos produzidos contra os polipeptídeos específicos do verme (ou produzidos contra um extrato do verme total ou extrato do órgão reprodutivo dos vermes, ou extrato do intestino dos vermes) podem ser usados para capturar, detectar e distinguir entre os antígenos de ascarídeo, antígenos de tricurídeo e antígenos de ancilostomídeo em um mamífero. A especificidade de cada tipo de verme é surpreendente, porque os ascarídeos, os tricurídeos e os ancilostomídeos todos são nematoides relacionados, e seria esperada uma reação cruzada de um anticorpo produzido contra uma proteína isolada de qualquer um desses vermes com um ou mais dos outros vermes, antígenos hospedeiros, ou outros componentes hospedeiros.

[0039] Além disso, foi determinado que este anticorpo pode ser utilizado para capturar e detectar antígenos de ascarídeo, antígenos de tricurídeo e antígenos de ancilostomídeo em um mamífero, logo após 9 dias em que mamífero foi infectado. Essa capacidade de detectar o ascarídeo, o tricurídeo ou o ancilostomídeo, logo após a infecção, e antes do aparecimento de qualquer óvulo nas fezes do mamífero infectado é surpreendente, porque os óvulos geralmente não

aparecem nas fezes de um hospedeiro infectado até cerca de cinco a oito semanas após o hospedeiro ter sido infectado.

[0040] A presente invenção inclui, portanto, métodos, dispositivos e kits que utilizam os anticorpos e/ou fragmentos dos mesmos, para, especificamente, capturar, detectar e distinguir entre os antígenos de ascarídeo, de tricurídeo e de ancilostomídeo em um mamífero. A capacidade da presente invenção em detectar e diagnosticar os ascarídeos mesmo quando um ou mais tipos de verme também estão presentes, permite ao profissional de saúde do mamífero a oportunidade de otimizar a escolha de um tratamento para livrar o mamífero do ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo. Além disso, a capacidade da presente invenção, em alguns casos, de detectar o ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo, em 9 dias após o mamífero ter sido infectado fornece a possibilidade do profissional de saúde poder começar tal tratamento antes do mamífero ficar gravemente doente. Uma intervenção antes do aparecimento dos óvulos nas fezes também reduziria grandemente ou eliminaria a possibilidade de que a infestação fosse espalhada para outros animais ou seres humanos.

II. DEFINIÇÕES E USOS DO TERMO

[0041] O termo "composições da invenção" refere-se a todos os ácidos nucleicos, os polipeptídeos, os anticorpos e as misturas que incluem um ou mais destes ácidos nucleicos, polipeptídeos e anticorpos e um ou mais outros compostos, que podem ser usados para detectar a presença ou a ausência de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo em uma amostra obtida de um mamífero através da realização do método da presente invenção, que são explicitamente descritos e implicitamente abrangidos ou de outra maneira descritos aqui.

[0042] "Uma amostra de um mamífero", na qual o ascarídeo, o tricurídeo e/ou o ancilostomídeo podem ser detectados pela presente

invenção, inclui todos os componentes corporais e os extratos dos mesmos, tal como qualquer fluido, sólido, célula ou tecido, que são capazes de conter antígenos de ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo. As amostras exemplares incluem, portanto, mas não estão limitados a serem, fezes, leite, sangue total e porções dos mesmos, incluindo soro, e ainda incluem extratos de tecidos, incluindo, por exemplo, o tecido da glândula mamária, fígado, intestino, coração, pulmão, esôfago, cérebro, músculo e olho. A amostra pode ser tomada diretamente do mamífero ou a amostra pode ser tomada a partir de qualquer coisa que tenha tido contato com o mamífero. Por exemplo, a amostra pode ser os dejectos fecais frescos ou em decomposição do mamífero. Como outro exemplo, a amostra pode incluir solo, terra, areia, material de planta ou qualquer outro material que possa ser misturado com os componentes corporais que podem ser deixados para trás pelo mamífero, tais como as fezes, por exemplo. Como tal, a amostra pode ser tomada a partir de uma fonte ambiental, incluindo solo, material em decomposição ou material de fezes de florestas, fazendas ou ambientes residenciais, incluindo caixa sanitária, pátios, jardins, caixas de areia, playgrounds, parques e praias. Não importa a origem ou o conteúdo da amostra, esta amostra é, algumas vezes, referida aqui como a "amostra", a "amostra de mamíferos", a "amostra-teste" ou a "amostra sob teste."

[0043] Como usado aqui, o termo "ácido nucleico" é sinônimo de, e, portanto, é usado alternadamente como "gene", "DNA", "cDNA", "EST", "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", "ácido polinucleico", "RNA" e "mRNA". Um ácido nucleico pode ser de forma filamentada dupla ou pode ser de forma filamentada simples. Além disso, um ácido nucleico ou é naturalmente isolado, tal como, por exemplo, a partir de um ascarídeo, de um tricurídeo e/ou de um ancilostomídeo em suas totalidades ou uma porção dos mesmos, ou é sintetizado

artificialmente, ou em um organismo hospedeiro recombinante ou através de qualquer outro meio artificial conhecido pelo versado na técnica, tal como através do emprego de uma técnica baseada em PCR, através da criação de um organismo transgênico que sintetize o ácido nucleico, utilizando uma máquina de síntese de DNA, ou através de qualquer outra técnica de base molecular , por exemplo.

[0044] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são termos sinônimos que são usados alternadamente para se referir aqui a um polímero de resíduos de aminoácidos. Um polipeptídeo, um peptídeo e uma proteína da presente invenção podem ser ou naturalmente isolados, tal como, por exemplo, a partir de ascarídeo, de tricurídeo ou de ancilostomídeo em sua totalidade ou em uma parte de ascarídeo, tricurídeo ou ancilostomídeo, ou artificialmente sintetizado, ou em um organismo hospedeiro recombinante ou através de qualquer outro meio artificial conhecido pelo versado na técnica.

[0045] O termo "anticorpo" ou "anticorpo da presente invenção" refere-se a qualquer anticorpo que é capaz de se ligar, especificamente, a um ou mais antígenos de um determinado verme, sem ligação a antígenos dos outros vermes. Por exemplo, os anticorpos para um ou mais antígenos de ascarídeo são capazes de se ligarem especificamente a um ou mais antígenos de ascarídeo, mas não a quaisquer antígenos de ancilostomídeo ou de tricurídeo e os anticorpos para um ou mais antígenos de tricurídeo são capazes de se ligarem especificamente a um ou mais antígenos de tricurídeos, mas não a qualquer antígenos de ascarídeo e de ancilostomídeo. Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos contra um ou mais polipeptídeos imunogênicos da presente invenção. A menos que indicado ao contrário, é para ser entendido que o anticorpo da presente invenção pode incluir uma mistura de dois ou mais tipos diferentes de anticorpos. Por exemplo, o anticorpo pode ser uma

mistura de dois tipos de anticorpos, em que um dos dois tipos se liga, especificamente, a um determinado antígeno e os outros dois tipos se ligam, especificamente, a alguns outros antígenos.

[0046] O termo "primeiro anticorpo", tal como aqui utilizado, significa um ou mais anticorpos capazes de ligarem, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo.

[0047] O termo "segundo anticorpo", tal como aqui utilizado, significa um ou mais anticorpos capazes de ligarem, especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo.

[0048] O termo "terceiro anticorpo", tal como aqui utilizado, significa um ou mais anticorpos capazes de ligarem, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ascarídeo.

[0049] O "polipeptídeo imunogênico da presente invenção" e, mais simplesmente, o "polipeptídeo da presente invenção", é um imunógeno contra o qual os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos. Todos os "polipeptídeos da presente invenção" são imunogênicos e, portanto, podem ser usados para induzir uma resposta imune em um animal hospedeiro para produzir os anticorpos da presente invenção. A menos que indicado de outra maneira, é para ser entendido que o polipeptídeo da presente invenção pode ser um componente de uma composição mista de uma pluralidade de componentes.

[0050] Um "imunógeno" é qualquer agente, tal como, por exemplo, o polipeptídeo imunogênico da presente invenção, que seja capaz de induzir uma resposta imune em um animal que esteja exposto a esse agente.

[0051] O termo "ascarídeo", como utilizado aqui, refere-se aos

helminthos, tais como os ascarídeos intestinais da ordem *Ascaridida*, que incluem os gêneros *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris*, *Ascaris*, *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Dessa maneira, o termo "ascarídeo", como utilizado aqui, não se refere à totalidade do filo Nematoda. Portanto, "ascarídeo" não inclui qualquer membro do gênero *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Necator*, *Trichuris*, *Wuchereria*, *Brugia* ou *Dirofilaria*.

[0052] Um "coproantígeno de ascarídeo" é qualquer produto de ascarídeo que esteja presente nas fezes de um mamífero possuindo uma infecção por ascarídeo e que pode ser ligado, especificamente, por um ou mais dos anticorpos da invenção. Por exemplo, um coproantígeno de ascarídeo pode ser, mas não se limita a ser, um ou mais dos polipeptídeos da invenção. Os presentes inventores determinaram que uma nova isoforma de 7kD do terminal C de DIV6728, que é uma proteína excretora/secretora de proteínas de *T. canis*, está presente nas fezes dos caninos infectados por *T. canis*, tão logo 38 dias após os caninos tornaram-se infectados por *T. canis*. Portanto, um "coproantígeno de ascarídeo" pode ser essa nova isoforma de 7kD do terminal C de DIV6728 (que é referida aqui como "Copro6728") que foi observada nas fezes caninas pelos presentes inventores.

[0053] O termo "tricurídeo", como utilizado aqui, refere-se aos helmintos, tais como os tricurídeos intestinais dos gêneros *Trichuris* e *Trichocephalus*. Os tricurídeos exemplares incluem, portanto, *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris discolor* e *Trichocephalus trichiuris*. Além disso, o termo "tricurídeo", como utilizado aqui, não se refere à totalidade do filo Nematoda. Por exemplo, "tricurídeo" não inclui qualquer membro do gênero *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Necator*, *Toxocara*, *Toxascaris*, *Ascaris*, *Wuchereria*, *Brugia* ou *Dirofilaria*.

[0054] Um "coproantígeno de tricurídeo" é qualquer produto de tricurídeo que esteja presente nas fezes de um mamífero possuindo uma infecção por tricurídeo e que pode ser ligado, especificamente, por um ou mais dos anticorpos da invenção. Por exemplo, um coproantígeno de tricurídeo pode ser, mas não se limita a ser, um ou mais dos polipeptídeos da invenção.

[0055] O termo "ancilostomídeo", como utilizado aqui, refere-se aos helmintos, tais como os ancilostomídeos intestinais do gênero *Ancylostoma*, *Necator* e *Uncinaria*. Os ancilostomídeos exemplares incluem, portanto, *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Ancylostoma pluriidentatum*, *Necator americanus* e *Uncinaria stenocephala*. Além disso, o termo "ancilostomídeo", como utilizado aqui, não se refere à totalidade do filo Nematoda. Por exemplo, o "ancilostomídeo" não inclui qualquer membro do gênero *Trichuris*, *Trichocephalus*, *Toxocara*, *Toxascaris*, *Ascaris*, *Wuchereria*, *Brugia* ou *Dirofilaria*.

[0056] Um "coproantígenos de ancilostomídeo" é qualquer produto de ancilostomídeo que está presente nas fezes de um mamífero possuindo uma infecção por ancilostomídeo e que pode ser ligado, especificamente, por um ou mais dos anticorpos da invenção. Por exemplo, um coproantígeno de ancilostomídeo pode ser, mas não se limita a ser, um ou mais dos polipeptídeos da invenção. Os presentes inventores determinaram que uma nova isoforma de 28 kDa do terminal N de ASP5, que é uma proteína de *Ancylostoma* excretora/secretora, está presente nas fezes dos caninos infectados por *Ancylostoma*, tão logo 9 dias após os caninos tornaram-se infectados com o *Ancylostoma*. Portanto, um "coproantígenos de ancilostomídeo" pode ser esta nova isoforma de 28 kDa do terminal N de ASP5 (que é aqui referida como "CoproASP5") que tem sido

observado nas fezes caninas pelos presentes inventores.

[0057] Os termos "específicos para", "liga-se especificamente", e "liga-se estavelmente" significam que uma determinada composição da invenção, tal como um anticorpo, polipeptídeo ou oligonucleotídeo da presente invenção, por exemplo, reconhece e liga-se a um ou mais outros agentes com maior afinidade do que a pelo menos um outro agente. Como um exemplo, um anticorpo da presente invenção é dito ser "específico para", para "ligar especificamente", e para "ligar estavelmente" antígenos de ascarídeo sempre que o anticorpo for capaz de reconhecer e se ligar aos antígenos de ascarídeo com maior afinidade do que a quaisquer outros antígenos a partir de um verme parasita não ascarídico. Tal especificidade de ligação pode ser testada utilizando a metodologia bem conhecida na técnica, por exemplo, ELISA ou radioimunoensaio (RIA). Com base na informação observada em relação à especificidade de ligação de uma determinada composição da invenção, o método da presente invenção pode ser realizado sob condições que permitam que a composição de ligar-se a (e, portanto, para permitir a detecção de tal ligação a) um determinado agente ou agentes, mas não para ligar-se a outros agentes de forma significativa, enquanto as condições forem mantidas. Como um exemplo, o método da presente invenção pode ser realizado sob condições que permitam que um anticorpo da presente invenção de ligar-se a (e, portanto, para permitir a detecção de tal ligação a) um ou mais antígenos de ascarídeo presentes em uma determinada amostra, mas não de forma significativa a qualquer antígeno de ancilostomídeo ou de tricurídeo que podem estar presentes na amostra, permitindo assim a distinção entre os ascarídeos, os tricurídeos e os ancilostomídeos.

[0058] "Detectar áscarídeo" significa detectar um ou mais produtos específicos de ascarídeo, incluindo, por exemplo, um ou mais dos

polipeptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos da presente invenção, ou um ou mais antígenos de ascarídeo, ou Copro6728. A presença de um ou mais dos tais produtos de ascarídeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero possui uma infecção por ascarídeo, independentemente de se qualquer organismo de ascarídeo completo ou óvulos do mesmo também estejam presente na amostra. Inversamente, a ausência de um ou mais dos tais produtos de ascarídeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero não possui uma infecção por ascarídeo.

[0059] "Detectar tricurídeo" significa detectar um ou mais produtos específicos de tricurídeo, incluindo, por exemplo, um ou mais dos polipeptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos da presente invenção, ou um ou mais antígenos de tricurídeo. A presença de um ou mais dos tais produtos de tricurídeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero possui uma infecção por tricurídeo, independentemente de se qualquer organismo de tricurídeo completo ou óvulos do mesmo também estejam presente na amostra. Inversamente, a ausência de um ou mais dos tais produtos de tricurídeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero não possui uma infecção por tricurídeo.

[0060] "Detectar ancilostomídeo" significa detectar um ou mais produtos específicos de ancilostomídeos, incluindo, por exemplo, um ou mais dos polipeptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos da presente invenção, ou um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou CoproASP5. A presença de um ou mais dos tais produtos de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero possui uma infecção por ancilostomídeo, independentemente de se qualquer organismo de ancilostomídeo completo ou óvulos do mesmo também estejam presente na amostra. Inversamente, a ausência de um ou mais dos tais produtos de ancilostomídeo em uma amostra de um

mamífero é indicativo de que o mamífero não possui uma infecção por ancilostomídeo.

[0061] "Aminoácido" refere-se aos aminoácidos sintéticos e que ocorrem naturalmente. Os resíduos de aminoácidos estão abreviados da seguinte forma: Alanina é A ou Ala; Arginina é R ou Arg; Asparagina é N ou Asn; Ácido aspártico é D ou Asp; Cisteína é C ou Cis; Ácido glutâmico é E ou Glu; Glutamina é Q ou Gln; Glicina é G ou Gli; Histidina é H ou His; Isoleucina é I ou Ile; Leucina é L ou Leu; Lisina é K ou Lis; Metionina é M ou Met; Fenilalanina é F ou Fe; Prolina é P ou Pro; Serina é S ou Ser; Treonina é T ou Thr; Triptofano é W ou Trp, Tirosina é Y ou Tir; e Valina é V ou Val. Exceto onde definido de outra maneira aqui, X ou Xaa representa qualquer aminoácido. Outros aminoácidos relevantes incluem, mas não estão limitados a ser, 4-hidroxiprolina e 5-hidroxisina. Em todos os casos, a sequência de aminoácido de um polipeptídeo descrita ou de outra maneira mencionada aqui, é apresentada na forma convencional em que o resíduo de aminoácido mais à esquerda, ou em primeiro lugar, da sequência é o resíduo do terminal N e o resíduo de aminoácido mais à direita, ou em último lugar, da sequência é o resíduo do terminal C.

[0062] Uma "variante conservadora" de qualquer determinada sequência de ácido nucleico inclui qualquer sequência possuindo uma ou mais substituições de códon degenerado à determinada sequência de ácido nucleico, qualquer sequência possuindo uma ou mais substituições, inserções e exclusões de nucleotídeos a uma determinada sequência de ácido nucleico, e a sequência complementar de determinado ácido nucleico e as variantes conservadoras da sequência complementar. As variantes conservadoras de uma determinada sequência de ácido nucleico, preferivelmente, possuem, pelo menos, cerca de 85% de identidade,

mais preverivelmente possuem, pelo menos, cerca de 90% de identidade, e mais preferivelmente ainda possuem, pelo menos, cerca de 95 a 99% de identidade à determinada sequência de ácido nucleico. As variantes conservadoras de uma determinada sequência de ácido nucleico podem ser artificialmente sintetizadas ou podem ser isoladas em sua forma natural a partir de um organismo.

[0063] Uma "variante conservadora" de qualquer determinada sequência de polipeptídeo é qualquer polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que varia a partir da sequência de aminoácidos de determinado polipeptídeo, mas que ainda mantém as propriedades de ligação específicas do determinado polipeptídeo, de tal forma que um anticorpo da presente invenção que é produzido contra determinado polipeptídeo é capaz de se ligar especificamente ao polipeptídeo variante. Portanto, uma variante conservadora de um determinado polipeptídeo, por exemplo, pode possuir uma ou mais substituições, deleções, adições e inserções de aminoácido ao polipeptídeo específico. Por exemplo, uma variante conservadora de um determinado polipeptídeo pode possuir 30 ou menos, 25 ou menos, 20 ou menos, 15 ou menos, 10 ou menos, ou 5 ou menos substituições de aminoácidos conservadoras ao determinado polipeptídeo. As variantes conservadoras de um determinado polipeptídeo preferencialmente, mas não essencialmente, possuem pelo menos, cerca de 80% de identidade, mais preferencialmente possuem, pelo menos, cerca de 90% de identidade, e mais preferencialmente ainda, possuem pelo menos, cerca de 91 a 99% de identidade ao determinado polipeptídeo. A porcentagem da identidade para qualquer ácido nucleico ou sequência de aminoácidos em assunto (por exemplo, qualquer um dos polipeptídeos descritos aqui) em relação ao outro ácido nucleico ou sequência de aminoácido-"alvo" pode ser determinada como se segue. Primeiro, um ácido nucleico ou

uma sequência de aminoácido-alvo da invenção pode ser comparado e alinhado a um ácido nucleico ou a uma sequência de aminoácido em assunto, utilizando as Sequências BLAST 2 (BI2seq), programa da versão autônoma de BLASTZ contendo BLASTN e BLASTP (por exemplo, a versão 2.0.14). A versão autônoma de BLASTZ pode ser obtida no site www.ncbi.nlm.nih.gov. As instruções explicando como usar o BLASTZ e, especificamente, o programa BI2seq, podem ser encontradas no arquivo 'readme' que acompanha o BLASTZ. Os programas também são descritos em detalhe por Karlin e outros (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2264; Karlin e outros. (1990) Proc. Acad. Sci. 90:5873; and Altschul *et al.* 90:5873 e Altschul e outros (1997) Nucl. Acids Res. 25:3389.

[0064] O termo "CoproASP5" refere-se a um fragmento de 28kD do terminal N de ASP5, encontrado nas fezes de mamíferos.

[0065] O termo "Copro6728" refere-se a uma porção de 7kD do terminal C de DIV6728, encontrada nas fezes de mamíferos. Em uma modalidade específica, copro6728 não inclui o terminal C do comprimento total de DIV6728 .

[0066] BI2seq realiza uma comparação entre a sequência em assunto e uma sequência-alvo usando tanto um algoritmo de BLASTN (utilizado para comparar as sequências de ácidos nucleicos) quanto um BLASTP (utilizado para comparar sequências de aminoácidos). Tipicamente, os parâmetros-padrão de uma matriz de pontuação BLOSUM62, o intervalo do custo de existência de 11 e o custo de extensão de 1, uma palavra de tamanho 3, um valor esperado de 10, um custo por resíduo de 1 e uma razão de λ de 0,85 são utilizados durante a realização do alinhamento da sequência de aminoácidos. O arquivo de saída contém regiões alinhadas de homologia entre a sequência-alvo e a sequência em assunto. Uma vez alinhado, o comprimento é determinado pela contagem do número de

nucleotídeos consecutivos ou dos resíduos de aminoácidos (isto é, excluindo os intervalos) da sequência-alvo que se alinham com a sequência da sequência de partida em assunto com qualquer posição combinada e termina com qualquer outra posição combinada. Uma posição combinada é qualquer posição em que um nucleotídeo idêntico ou o resíduo de aminoácido está presente tanto na sequência-alvo quanto na em assunto. Os intervalos de um ou mais resíduos podem ser inseridos em uma sequência-alvo ou em assunto para maximizar o alinhamento das sequências entre os domínios conservados estruturalmente (por exemplo, α -hélices, β -folhas, e conjuntos).

[0067] A porcentagem da identidade sob um determinado comprimento é determinada pela contagem do número de posições combinadas sob o determinado comprimento, dividindo esse número pelo comprimento e multiplicando o valor resultante por 100. Por exemplo, se (i) uma sequência-alvo de 500 aminoácidos é comparada a uma sequência de aminoácidos em assunto, (ii) o programa BL2seq apresenta 200 aminoácidos da sequência-alvo alinhados com uma região da sequência em assunto em que o primeiro e o último aminoácido da região de 200 aminoácidos são combinados, e (iii) o número de combinações sob esses 200 aminoácidos alinhados é de 180, então a sequência-alvo de 500 aminoácidos contém um comprimento de 200 e uma sequência de identidade sob esse comprimento de 90% (isto é, $180/200 \times 100 = 90$). Observa-se que um ácido nucleico ou uma sequência de aminoácidos alvo que se alinha com uma sequência em assunto pode resultar em muitos comprimentos diferentes com cada comprimento possuindo sua própria porcentagem de identidade. Nota-se que o valor da porcentagem de identidade pode ser arredondado para o décimo mais próximo. Por exemplo, 78,11, 78,12, 78,13 e 78,14 são arredondados

para 78,1, enquanto 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 e 78,19 são arredondados para 78,2. Nota-se também que o valor do comprimento será sempre um número inteiro.

[0068] As variantes conservadoras de uma determinada sequência polipeptídica podem ser artificialmente sintetizadas ou podem ser isoladas em sua forma natural de um organismo, incluindo, por exemplo, um organismo de áscarídeo, como *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Ascaris*, um organismo de tricurídeo, como *Trichuris* e *Trichocephalus* e um organismo de ancilostomídeo, tais como *Ancylostoma*, *Necator* e *Uncinaria*. Em um exemplo não limitado, específico para ascarídeo, o polipeptídeo da invenção possuindo uma sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 27, mostrada abaixo, é uma variante conservadora do polipeptídeo da presente invenção possuindo uma sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 26, na qual a SEQ ID NO: 27 é mais de 95% idêntica à SEQ ID NO: 26 sob um alinhamento de 126 aminoácidos. Em termos mais gerais, cada uma das SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30 são variantes conservadoras uma das outras. Também é preciso entender que outras variantes conservadoras da SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30 são contempladas pela presente invenção, conforme descrito aqui, mas o versado na técnica irá reconhecer que todas essas variantes contempladas são muito numerosas para serem listadas. O versado na técnica também irá reconhecer que essas variantes incluem, mas não estão limitadas, àquelas que possuem uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos básicos, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos acídicos, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos polares, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, uma ou mais substituições de

resíduos de aminoácidos aromáticos e uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos pequenos. (Resíduos "Básicos" de aminoácidos são K, R e H. Resíduos de aminoácidos "acídicos" são D e E. Resíduos de aminoácidos "polares" são N e Q. Resíduos de aminoácidos "hidrofóbicos" são I, L e V. Resíduos de aminoácidos "aromáticos" são F, Y e W. Resíduos de aminoácidos "pequenos" são G, S, A, T e M.)

III. ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DA INVENÇÃO

[0069] Os ácidos nucleicos e polipeptídeos da invenção são descritos, em detalhes, nos Pedidos de Patente Provisórios: "Métodos, Dispositivos, kits e Composições para Detectar Tricurídeo", Pedido de Patente Nº de Série: 61/128.077, depositado em 19 de maio de 2008; "Métodos, Dispositivos, Kits e Composições para Detectar Ascarídeo", Pedido de Patente Nº de Série 61/128.079, depositado em 19 de maio de 2008, "Métodos, Dispositivos, Kits e Composições para Detectar Ascarídeo", Pedido de Patente Nº de Série 61/128.076, depositado em 19 de maio de 2008; "Métodos, Dispositivos, Kits e Composições para Detectar Ascarídeo", Pedido de Patente Nº de Série 61/128.099, depositado em 19 de maio de 2008; "Composições, Dispositivos, Kits e Métodos para Detectar Ancilostomídeo", Pedido de Patente Nº de Série 61/122.254, depositado em 12 de dezembro de 2008; e Pedidos de Patente Utilitários: "Detecção de Coproantígeno de Ascarídeo", Pedido de Patente Nº de Série 11/763 Serial, 592, depositado em 15 de junho de 2007 e "Dispositivo, Kit e Método para Detectar Antígeno de Ancilostomídeo", Pedido de Patente Nº de Série 11/763.583, depositado em 15 de junho de 2007, "Métodos, Dispositivos, Kits e Composições para Detectar Ascarídeo" depositado simultaneamente com os mesmos aqui, e todos estão incorporados por referência na sua totalidade.

[0070] Na tentativa de identificar as composições que podem ser

utilizadas para confirmar a presença ou a ausência de ascarídeo em uma amostra de fezes e distinguir o ascarídeo de outras infecções pelo verme parasitárias, uma pluralidade de iniciadores de oligonucleotídeo foram designados, sintetizados e utilizados nas reações 5' RACE, 3' RACE e RT-PCR, que incluíram o RNA total isolado de ou *Toxocara canis* adulto completo ou *Toxocara cati* adulto completo. Como resultado destes esforços, uma sequência cDNA de 469 nucleotídeos foi deduzida a partir de *Toxocara canis* (identificado aqui como SEQ ID NO: 25), e uma sequência cDNA de 548 nucleotídeos foi deduzida a partir de *Toxocara cati* (identificado aqui como SEQ ID NO: 26). (As pesquisas BLAST que foram realizadas utilizando as SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26 indicaram que essas sequências são prováveis para codificar os membros das famílias do inibidor de protease serina, que foram primeiramente identificadas na *Ascaris*, mas que não foram identificadas tanto na *T. canis* quanto na *T. cati* até agora.)

[0071] Na tentativa de identificar as composições que podem ser utilizadas para confirmar a presença ou a ausência de tricurídeo em uma amostra de fezes e distinguir o tricurídeo de outras infecções por verme parasitárias, uma pluralidade de iniciadores de oligonucleotídeo foram designados, sintetizados e utilizados nas reações 5' RACE, 3' RACE e RT-PCR, que incluíram RNA total isolado a partir de *Trichuris vulpis* adulto completo. Como resultado destes esforços, foram deduzidas uma sequência cDNA de 1210 nucleotídeos e uma sequência cDNA de 1059 nucleotídeos (identificada aqui como SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente). (As pesquisas BLAST que foram realizadas utilizando as SEQ NO: 1 e SEQ ID NO: 2 indicaram que estas sequências são prováveis de codificar porinas, que é uma grande proteína excretora/secretora de tricurídeo, que tem sido descrita no *Trichuris muris* parasita do rato e *Trichuris Trichiuria*

parasita do ser humano, mas que não foram identificadas em *Trichuris vulpis* até agora.)

[0072] Anteriormente, Zhan e colegas descreveram a identificação molecular e a caracterização parcial de ASP-5, que é uma proteína excretora/secretora de *Ancylostoma* (Vide Zhan e outros. *International Journal for Parasitology* 33:897-907 (2003)). Em seus estudos, o grupo Zhan descreveu uma forma única da proteína ASP-5 possuir uma massa de cerca de 56 kDa, secretada em parasitas cultivados *in vitro*.

[0073] A proteína ASP-5, incluindo uma etiqueta His6 do terminal N (SEQ ID NO: 33), pode ser codificada pela sequência nucleica da SEQ ID NO: 31:

```

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGG
CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGAC
AGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCACC ACTTGTCCAG
GAAATGATCTAACAGATGCTGAACGCACACTGCTAACTAGGGTGC
ACAATTCCATTCGACGGGAAATAGCGCAAGGAGTTGCAAACA ACT
ACCATGGTGGTAAACTGCCTGCTGGAAAGAACATATACAGGATGA
GATACAGCTGTGAGCTGGAACAGGCTGCTATTGATGCTAGTCAAA
CCTTCTGTTCCGCATCATTGGAGGAACACAGAAATATGGACAAA
ACATCCAAGCATAACGTCACACCATCTATAATCGCTCGCCCGAAAA
ACGACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCTGCCTGTTAT
CTACTACGGCCAACGCGACGCGGCCAACAAAGTTCACCGATCCGC
GCTTGTACACATTTGCAAACCTCGCCTACGACAAGA AACTGCAC
TTGGCTGTCACTATGCGAAATGTCAAGGCCCTGACAGAATCGTCA
TTAGTTGCATGTACAACAACGTCGTTCTGACAACGCTGTGATCTA
CGAGCCAGGAACTGCTTGC GTAAAAGATCAGGACTGCACTACTTA
TCCTCAGTCCACATGCAAGGACAGCCTTTGCATTATTCCTACGCC
ACATCCACCAAATCCACCAAATCCACCACCTGCAATGTGTCCAAA
CGCTGAAATGACTGATGCAGCACGAAAGAAGGTCCTCGACATGCA
CAACTGGCGCAGATCGCAGCTCGCTCTGGGAAACGTTCAAAACG

```

GGAAAAATGCTTACAACCTGCCCCACTGCAACAGACATGTACAAGA
 TGGAATATGATTGCGACCTCGAGAACAGCGCTCTAGCGTATGCAA
 AGCAATGTAGTCTCGTTGGTTCAGCAGAAGGAACTCGTCCAGGAG
 AAGGCGAGAATGTCCACAAAGGCGCTCTCGTAACCGATCCGGAG
 GCTGCAGTTCAGACCGCAGTTCAAGCATGGTGGAGTCAAATCTCA
 CAAAATGGACTCAATGCACAGATGAAATTCAGTCTTTCTTGAAGG
 ACAAGCCTGACGCTCCGACAGCGTTTACACAGATGGCGTGGGCC
 AAATCCGTAAAGCTTGGATGTGCTGTCTCTAATTGTCAGGCAGATA
 CCTTCACCGTCTGTAGATACAAAGCTGCCGGAAACATCGTGGGCG
 AATTCATCTATACCAAGGGAAATGTATGCGACGCCTGTAAAGCCA
 CATGCATTACCGCGGAAGGTCTTTGCCCAACGCCTTGAGCGGCC
 GC (SEQ ID NO: 31)

[0074] Em um esforço para identificar as ferramentas para capturar e detectar o antígeno de ascarídeo e/ou de ancilostomídeo em mamíferos infectados por ancilostomídeo, os presentes inventores determinaram que uma proteína modificada de cerca de 28 kDa, ao invés da versão de 56 kDa, está presente nas fezes dos caninos que estão infectados pelo *Ancylostoma*. (Esta versão de 28 kDa de ASP5 é aqui referida como "CoproASP5"; a detecção de CoproASP5 nas fezes dos caninos infectados pelo *Ancylostoma* é descrita na seção de exemplos, incluída aqui.) Em um aspecto, portanto, a presente invenção fornece polipeptídeos que podem ser usados para gerar anticorpos que podem ser usados, especificamente, para capturar e detectar CoproASP5. Tal polipeptídeo que pode ser usado para gerar anticorpos que podem ser usados para ligar CoproASP5 é referido como polipeptídeo ASP5-1, que pode ser codificado pela sequência de ácido nucleico a seguir:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGG
 CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGAC
 AGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCACCACTTGTCCAG

GAAATGATCTAACAGATGCTGAACGCACACTGCTAACTAGGGTGC
 ACAATTCCATTTCGACGGGAAATAGCGCAAGGAGTTGCAAACAAC
 ACCATGGTGGTAAACTGCCTGCTGGAAAGAACATATACAGGATGA
 GATACAGCTGTGAGCTGGAACAGGCTGCTATTGATGCTAGTCAAA
 CCTTCTGTTCCGCATCATTGGAGGAACACAGAAATATGGACAAA
 ACATCCAAGCATACGTCACACCATCTATAATCGCTCGCCCGAAAA
 ACGACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCTGCCTGTTAT
 CTACTACGGCCAGCGCGACGCGGCCAACAAGTTTACGGATCCGC
 GCTTGTACACATTTGCAAACCTCGCCTACGACAAGAACACTGCAC
 TTGGCTGTCACTATGCGAAATGTCAAGGCCCTGACAGAATCGTCA
 TTAGTTGCATGTACAACAACGTCGTTCTGACAACGCAGTGATCTA
 CGAGCCTGGAACCTGCTTGCGTAAAAGATGCGGACTGCACTACTTA
 TCCTCAGTCCACATGCAAGGACAGCCTTTGCATTATTCCTACGCC
 ACATCCACCAAATCCACCAAATCCACCACCAGCAATGAGTCCATG
 AGCGGCCGC (SEQ ID NO: 32)

[0075] Um versado na técnica vai apreciar que, devido à degeneração do código genético, as sequências de ácido nucleico, exceto a SEQ ID NO: 32, podem codificar para o polipeptídeo de SEQ ID NO: 34, se forem feitas substituições de códons apropriadas (silenciosas).

[0076] A análise das sequências de ascarídeo correspondentes as SEQ ID NO: 24 e SEQ ID NO: 25 indicou que cada uma dessas sequências de ascarídeo contém uma estrutura de leitura aberta (ORF) ampla. Especificamente, a ORF ampla da SEQ ID NO: 24 corresponde aos nucleotídeos 21 a 446 da SEQ ID NO: 24 e está previsto codificar um polipeptídeo de ascarídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MLPITFLLAIVGAAVAHRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQG
 EQPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRTADGRCVPEAQCPKRMVKRDE
 KCGPNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFVRN

DKGECIKFDDCPK (SEQ ID NO: 26).

[0077] Além disso, a ORF ampla da SEQ ID NO: 25 corresponde aos nucleotídeos 21 a 446 da SEQ ID NO: 25 e está previsto codificar um polipeptídeo de ascarídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MLPLTFLLAFIVGAAVAHRKCGPNEEWTECTGCEMKCGE
GETPCPMMCRPPSCECMAGKGLRRTPDGRCVPEAQCPKHMVKRD
EKCGKNEKFLKCRGCEGTCKERLVPCPKMCKPPGCECPASEGFVR
NDKHECIKFDDCPK (SEQ ID NO:27).

[0078] As SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30 estão descritas no Pedido de Patente Provisório Nº de Série 61/128.076, depositado em 19 de maio de 2008, que é incorporado por referência, na sua totalidade.

[0079] A análise das sequências de tricurídeo correspondentes as SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 indicou que cada uma dessas sequências de tricurídeo contém uma ORF ampla. Especificamente, a ORF ampla da SEQ ID NO: 1 corresponde aos nucleotídeos 32 a 1147 da SEQ ID NO: 1 e está prevista codificar um polipeptídeo de tricurídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MRLVFHAVIYLTGFLTDAVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCR
DDFDCGGRQKCCTIAEGRGCVPPYGEQHFEVVKPGHCPAIPAVTGM
ANFCNTDGDCDGPKKCCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPSK
PRIPGKWVDICAKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGERP
GNCPNEPRIRGTYDCRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVESRKPL
DKPGHCPIPADVGSARYCDTDRDCDGP RKCCCLSSRGYECKHPVHY
PDRVEPLVGECPPSRPRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNR
CMDVGLVPGQGEKPANCPKEPRIRGTYDCRRDDDCD GKQKCCYT
TEGRECVHGIWP (SEQ ID NO:3).

[0080] Além disso, a ORF ampla da SEQ ID NO: 2 corresponde

aos nucleotídeos 1 a 1059 da SEQ ID NO: 2, e está previsto codificar um polipeptídeo de tricurídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEG
 RGCVPYPYGEQDFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDGCDGPKKC
 CLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPSKPRVPGKWVDICAKHAN
 CPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGTKYDC
 RRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVESRKPLDKPGHCPIPADVGSAR
 YCDTDRDCDGP RKCC LSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRP
 RIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGKPA
 NCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ
 ID NO:4).

[0081] As 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, e SEQ ID NO: 9 estão descritas no Pedido de Patente Provisório 61/128,077, depositado em 19 de maio de 2008, que está incorporada por referência na sua totalidade.

[0082] A análise das sequências de ancilostomídeo correspondentes as SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, indicou que cada uma dessas sequências contém uma ORF ampla. Especificamente, como mostrada, a ORF ampla da SEQ ID NO: 10 corresponde aos nucleotídeos 2 a 616 da SEQ ID NO: 11 e está prevista codificar um polipeptídeo de ancilostomídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

KKIYGVAASRRRRHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQ
 MKKDGGKSKKELQDKIMHYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVV
 GEEKAAEIKALKDSGASKDELKAKVEEALHAVTDEEKKQHIAEFGPAC
 KKIYGVAASRRRRHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGGKSK
 KELQDKIMHYEHLEGMLLALCILY (SEQ ID NO:12).

[0083] Além disso, a ORF ampla da SEQ ID NO: 11 corresponde

aos nucleotídeos 1 a 11 e está previsto para codificar um polipeptídeo de ascarídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

IYGVAASRRRRHHFTLEKSLDTHLKWLSHEQKEELLKMKK
DGKSKKELQDKVMHFYEHLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVVGEE
KAAEIKALKDSGASKDELKAKVEDALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKEI
FGVPIDVRHKRDPYTNMTPDEVAEGLRS (SEQ ID NO:13).

[0084] As SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, e SEQ ID NO: 16 estão descritas no Pedido de Patente Provisório 61/128,079, depositado em 19 de maio de 2008, que é incorporada por referência na sua totalidade.

[0085] A análise das sequências de ascarídeo correspondentes as SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18 indicou que cada uma dessas sequências de ascarídeo contém uma estrutura de leitura aberta (ORF) ampla. Especificamente, a ORF ampla da SEQ ID NO: 17 corresponde aos nucleotídeos 28 a 456 da SEQ ID NO: 17 e está prevista para codificar um polipeptídeo de ascarídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MLSVLALFALITFAVAGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQ
DENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRRTNDGRCIPASQCPQHRAKRE
EQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFV
RDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:19).

[0086] Além disso, a ORF ampla da SEQ ID NO: 2 corresponde aos nucleotídeos 29 a 457 da SEQ ID NO: 18 e está prevista para codificar um polipeptídeo de ascarídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MLSVLALFALITFAVADPKSCGPNEVWTECTGCELKCGQ
DEDTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRRTDDGRCIPASQCPQHRAKRE
EQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFV
RDAAGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:20).

[0087] As SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, e SEQ ID NO: 23 estão descritas no Pedido de Patente Provisório Número de Série 61/128.099, depositado em 19 de maio de 2008, que é incorporada por referência na sua totalidade

[0088] A análise das sequências de ancilostomídeo correspondentes as SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32 indicou que cada uma dessas sequências de ancilostomídeo contém uma estrutura de leitura aberta (ORF) ampla. Especificamente, a ORF ampla da SEQ ID NO: 31 está prevista para codificar um polipeptídeo de ancilostomídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFE
LTTCPGNDLTDAERTLLTRVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIY
RMRYSCLEQAAIDASQTFCSASLEEPQKYGQNIQAYVTPSIIARPKN
DLLEDAVKQWYLPVIYYGQRDAANKFTDPRLYTFANLAYDKNTALGC
HYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPDNAVIEPGTACVKDQDCTTYPQST
CKDSLIIPTPHPPNPPNPPAMCPNAEMTDAARKKVLDMHNWRRS
QLALGNVQNGKNAYNCPTATDMYKMEYDCDLENSALAYAKQCSLVG
SAEGTRPGEGENVHKGALVTDPEAAVQTAVQAWWSQISQNGLNAQ
MKFTAFLKDKPDAPTAFTQMAWAKSVKLGCAVSNCQADTFTVCRYK
AAGNIVGEFIYTKGNVCDACKATCITAEGLCPTP (SEQ ID NO:33).

[0089] Os primeiros 38 aminoácidos da SEQ ID NO: 33 são derivados de um vetor de clonagem, o versado na técnica apreciará que esta parte pode ser omitida ou substituída por outros parceiros da fusão adequados.

[0090] Além disso, a ORF ampla da SEQ ID NO: 32 está prevista para codificar um polipeptídeo de ancilostomídeo possuindo a sequência de aminoácidos a seguir:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFE
LTTCPGNDLTDAERTLLTRVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIY

RMRYSCLEQAAIDASQTFCSASLEEPQKYGQNIQAYVTPSIIARPKN
 DLLEDAVKQWYLPVIYYGQRDAANKFTDPRLYTFANLAYDKNTALGC
 HYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPDNAVIEPGTACVKDADCTTYPQST
 CKDSLIIPTPHPPNPPNPPAMPSP (SEQ ID NO:34).

[0091] Os polipeptídeos da presente invenção são codificadas por ácidos nucleicos que possuem uma sequência de nucleotídeos que corresponde a todas ou a partes das 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 e SEQ ID NO: 32 e todas as variantes conservadoras dessas sequências. É para ser entendido, portanto, que a sequência de aminoácidos do polipeptídeo da presente invenção é variável.

[0092] Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponde à totalidade ou a uma parte das 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 e SEQ ID NO: 34 ou a totalidade ou a uma parte de uma variante conservadora das 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 e SEQ ID NO: 34.

[0093] Em um exemplo específico, o polipeptídeo de ascarídeo da presente invenção possui a sequência de aminoácidos a seguir:

MHRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGEQPCPMMCRPPSC

ECMAGKGLRRTADGRCVPEAQCPKRMVKRDEKCGPNEKFLKCRGC
EGTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFVRNDKGECIKFDDCPK
(SEQ ID NO: 28).

[0094] Em um exemplo específico, o polipeptídeo de tricurídeo da presente invenção possui a sequência de aminoácidos a seguir:

MVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAE
GRGCVPPYGEQHFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDGCDGPKK
CCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPPSKPRIPGKWVDICAKHAN
CPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIRGTKYDC
RRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVEPSRKPLDKPGHCPIPADVGSAR
YCDTDRDCDGPCKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRP
RIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPA
NCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ
ID NO:5).

[0095] Em um outro exemplo específico, o polipeptídeo de ascarídeo da presente invenção possui a sequência de aminoácidos a seguir:

MHHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQ
DKIMHYEHLLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDS
GASKDELKAKVEEALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKKIYGVAAS (SEQ
ID NO: 14).

[0096] Em outro exemplo específico, o polipeptídeo de ascarídeo da presente invenção possui a sequência de aminoácidos a seguir:

MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPS
CECSPGRGMRRTNDGRCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCR
GCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCKIFDDCP
K (SEQ ID NO: 21).

[0097] Em um outro exemplo específico, o polipeptídeo de ancilostomídeo da invenção inclui uma sequência de aminoácidos que é idêntica ou homóloga a uma sequência representada pela SEQ ID

NO: 34.

[0098] Os 125 resíduos de aminoácidos que seguem o resíduo de metionina do terminal N do polipeptídeo de ascarídeo correspondente à SEQ ID NO: 28 representam, especificamente, os resíduos de aminoácidos 18 a 142 da SEQ ID NO: 26. A metionina do terminal N foi artificialmente adicionada ao terminal N desse polipeptídeo através da realização de uma técnica de clonagem padrão. O anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 28 foi útil para detectar o antígeno de ascarídeo. Como a metionina do terminal N foi artificialmente adicionada, e não é imaginada para, naturalmente, existir em *Toxocara* (o resíduo que está imediatamente antes do resíduo de histidina na posição 18 em cada uma das SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27 é alanina, e não metionina), é, portanto, contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponda aos resíduos de aminoácidos 18 a 142 da SEQ ID NO: 26, ou, mais especificamente:

HRKCGPNEEWTECTGCEIKCGQGGEQPCPMMCRPPSCE
CMAGKGLRRTADGRCVPEAQCPKRMVKRDEKCGPNEKFLKCRGCE
GTCKERLVPCPRMCKPPGCECPASEGFVRNDKGECIKFDDCPK
(SEQ ID NO:29).

[0099] Os 353 resíduos de aminoácidos que seguem o resíduo de metionina do terminal N do polipeptídeo de tricurídeo correspondente à SEQ ID NO: 5 representam, especificamente, os resíduos de aminoácidos 20 a 353 da SEQ ID NO: 3. A metionina do terminal N foi artificialmente adicionada ao terminal N desse polipeptídeo através da realização de uma técnica de clonagem padrão. O anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 5 foi útil para detectar o antígeno de tricurídeo. Como a metionina do terminal N foi artificialmente adicionada, e não é imaginada para, naturalmente, existir em *Trichuris vulpis* (o resíduo que está imediatamente antes do

resíduo de valina na posição 20 na SEQ ID NO: 3 é alanina), é, portanto, contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponda aos resíduos de aminoácidos 20 a 353 da SEQ ID NO: 3 ou, mais especificamente:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEG
 RGCVPYPYGEQHFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDGCDGPKKC
 CLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPSKPRIPGKWVDICAKHANC
 PDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIRGTKYDCR
 RDDDCDGVQKCCFTVEGRECVESRKPLDKPGHCPPIPADVGSARY
 CDTDRDCDGPCKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRPRI
 PGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPANC
 PKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ ID
 NO:6).

[00100] Em um outro exemplo específico, o polipeptídeo de tricurídeo da presente invenção possui a sequência de aminoácidos a seguir:

MVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAE
 GRGCVPPYGEQDFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDGCDGPKK
 CCLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPSKPRVPGKWVDICAKHA
 NCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGTKYD
 CRRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVESRKPLDKPGHCPPIPADVGSAR
 YCDTDRDCDGPCKCCLSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSR
 PRIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPA
 NCPKEPRIRGTKYDCRRDDDCDGGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ
 ID NO:7).

[00101] Os 353 resíduos de aminoácidos que seguem o resíduo de metionina do terminal N do polipeptídeo de tricurídeo correspondente à SEQ ID NO: 7 representam, especificamente, os resíduos de aminoácidos 1 a 353 da SEQ ID NO: 4. A metionina do terminal N foi artificialmente adicionada ao terminal N desse polipeptídeo através da

realização de uma técnica de clonagem padrão. O anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 7 foi útil para detectar o antígeno de tricurídeo. Como a metionina do terminal N foi artificialmente adicionada, é, portanto, contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponda aos resíduos de aminoácidos 1 a 353 da SEQ ID NO: 4 ou, mais especificamente:

VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDFDCGGRQKCCTIAEG
 RGCVPPTYGEQDFEVVKPGHCPAIPAVTGMANFCNTDGDGCDGPKKC
 CLTSRGYDCTHPLHFPIQPQPPVGQCPSKPRVPGKWVDICAKHAN
 CPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGTTYDC
 RRDDDCDGVQKCCFTVEGRECVESRKPLDKPGHCPPIPADVGSAR
 YCDTDRDCDGP RKCC LSSRGYECKHPVHYPDRVEPLVGECPPSRP
 RIPGKWVDICSKHANCPDPEKCCDTEYGNRCMDVGLVPGQGEKPA
 NCPKEPRIRGTTYDCRRDDDCDGGKQKCCYTTEGRECVHGIWP (SEQ
 ID NO:8).

[00102] Os 129 resíduos de aminoácidos que seguem o resíduo de metionina do terminal N do polipeptídeo de ascarídeo correspondente à SEQ ID NO: 14 representam, especificamente, os resíduos de aminoácidos 14 a 142 da SEQ ID NO: 12. A metionina do terminal N foi artificialmente adicionada ao terminal N desse polipeptídeo através da realização de uma técnica de clonagem padrão. O anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 14 foi útil para detectar o antígeno de ascarídeo. Como a metionina do terminal N foi artificialmente adicionada, e não é imaginada para, naturalmente, existir em *Toxocara* (o resíduo que está imediatamente antes do resíduo de histidina na posição 14 em cada uma das SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO:13 é arginina, e não metionina), é, portanto, contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponda aos resíduos de

aminoácidos 14 a 142 da SEQ ID NO: 12 ou, mais especificamente:

HHFTLENSLDTHLKWLSHEQKEELLQMKKDGKSKKELQD
KIMHYEHLLEGDAKHEATEQLKGGCREILKHVVGEEKAAEIKALKDS
GASKDELKAKVEEALHAVTDEEKKQHIAEFGPACKKIYGVAAS (SEQ
ID NO: 15).

[00103] Com 128 aminoácidos, a proteína de ascarídeo DIV6728 (SEQ ID NO: 21) é de cerca de 14 kD em tamanho e com um pI teórico de cerca de 6,54. Esta proteína pertence à superfamília TIL, que é um grupo de inibidores de protease serina. Em um esforço para identificar as ferramentas para capturar e detectar os ascarídeos e/ou os antígenos de ascarídeo em mamíferos infectados pelo ascarídeo, os presentes inventores determinaram que apenas uma parte truncada (cerca de 7 kDa) do comprimento total da proteína (14 kDa) e, portanto, não a versão de 14 kDa, está presente nas fezes de caninos que são infectados pelo *T. canis*. (Esta parte truncada de 7 kDa de DIV6728 é aqui referida como "Copro6728"; a detecção de Copro6728 nas fezes de caninos infectados pelo *T. canis* é descrita na seção de Exemplos incluída aqui). Em um aspecto, portanto, a presente invenção refere-se aos polipeptídeos que podem ser utilizados para produzir anticorpos que podem ser usados, especificamente, para capturar e detectar Copro6728.

[00104] Os 127 resíduos de aminoácidos que seguem o resíduo de metionina do terminal N do polipeptídeo de ascarídeo correspondente à SEQ ID NO: 21 representam, especificamente, os resíduos de aminoácidos 17 a 143 da SEQ ID NO: 19. A metionina do terminal N foi artificialmente adicionada ao terminal N desse polipeptídeo através da realização de uma técnica de clonagem padrão. Também, como descrito através da seção de Exemplos, o anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 21 foi útil para detectar o antígeno de ascarídeo. Como a metionina do terminal N foi

artificialmente adicionada, e não é imaginada para, naturalmente, existir em *Toxocara* (o resíduo que está imediatamente antes do resíduo de glicina na posição 17 em cada uma das SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20 é alanina, e não metionina), é, portanto, contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir uma sequência de aminoácidos que corresponda aos resíduos de aminoácidos 17 a 143 da SEQ ID NO: 19 ou, mais especificamente:

GPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSC
ECSPGRGMRRRTNDGRCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRG
CEGTCAQRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK
(SEQ ID NO: 22).

[00105] Além disso, um alinhamento da SEQ ID NO: 28 (na sua maioria sequência derivada de *Toxocara canis*, com a única exceção sendo o resíduo de metionina do terminal N) para SEQ ID NO: 27 (sequência derivada de *Toxocara cati*) é mostrado na figura 14. Como o anticorpo produzido contra um polipeptídeo possuindo a sequência correspondente à SEQ ID NO: 28 foi útil na detecção de *Toxocara cati*, é contemplado adicionalmente que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 30, em que o X na posição 1 é M ou ausente, o X na posição 2 é L ou ausente, o X na posição 3 é P ou ausente, o X na posição 4 é L ou ausente (ou o X na posição 4 é I, que ocupa a posição 4 da SEQ ID NO: 26), o X na posição 5 é T ou ausente, o X na posição 6 é F ou ausente, o X na posição 7 é L ou ausente, o X na posição 8 é L ou ausente, o X na posição 9 é A ou ausente, o X na posição 10 é F ou ausente (ou o X na posição 10 é I, que ocupa a posição 10 da SEQ ID NO: 26), o X na posição 11 é I ou ausente, o X na posição 12 é V ou ausente, o X na posição 13 é G ou ausente, o X na posição 14 é A ou ausente, o X na posição 15 é A ou ausente, o X na posição 16 é V ou ausente, o X na posição 16 é M ou A, o X na

posição 35 é I ou M, o X na posição 39 é Q ou E, o X na posição 42 é Q ou T, o X na posição 65 é A ou P, o X na posição 78 é R ou H, o X na posição 88 é P ou K, o X na posição 111 é R ou K, e os X na posição 132 é o G ou H

[00106] Além disso, um alinhamento da SEQ ID NO: 3 em relação à SEQ ID NO: 4 é mostrado na figura 5. É contemplado, adicionalmente, que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir a sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 9, em que o X na posição 1 é M ou ausente, o X na posição 2 é de R ou ausente, o X na posição 3 é L ou ausente, o X na posição 4 é V ou ausente, o X na posição 5 é F ou ausente, o X na posição 6 é H ou ausente, o X na posição 7 é A ou ausente, o X na posição 8 é V ou ausente, o X na posição 9 é I ou ausente, o X na posição 10 é Y ou ausente, o X na posição 11 é L ou ausente, o X na posição 12 é T ou ausente, o X na posição 13 é L ou ausente, o X na posição 14 é G ou ausente, o X na posição 15 é F ou ausente, o X na posição 16 é L ou ausente, o X na posição 17 é T ou ausente, o X na posição 18 é D ou ausente, o X na posição 19 é A ou ausente (ou o X na posição 19 é M, que ocupa a posição 19 da SEQ ID NO: 5), o X na posição 69 é H ou D, o X na posição 136 é I ou V e o X na posição 172 é P ou A.

[00107] Além disso, um alinhamento da SEQ ID NO: 14 (na sua maioria sequência derivada de *Toxocara canis*, com a única exceção sendo o resíduo de metionina do terminal N) para SEQ ID NO: 13 (sequência derivada de *Toxocara cati*) é mostrado na figura 8. Como o anticorpo produzido contra um polipeptídeo possuindo a sequência correspondente à SEQ ID NO: 14 foi útil na detecção de *Toxocara cati*, é contemplado, adicionalmente, que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 16, em que o X na posição 1 é I ou ausente, o X na posição 2 é Y ou ausente, o X na posição 3 é o G ou ausente, o X na

posição 4 é V ou ausente, o X na posição 5 é A ou ausente, o X na posição 6 é A ou ausente, o X na posição 7 é S ou ausente, o X na posição 8 é R ou ausente, o X na posição 9 é R ou ausente, o X na posição 10 é R ou ausente, o X na posição 11 é R ou M, o X na posição 18 é N ou K, o X na posição 37 é Q ou K, o X na posição 52 é I ou V, o X na posição 55 é Y ou F, o X na posição 110 é E ou D, o X na posição 133 é K ou E, o X na posição 135 é Y ou F, o X na posição 138 é A ou P, o X na posição 139 é A ou I, o X na posição 140 é S ou D, o X na posição 141 é V ou ausente, o X na posição 142 é R ou ausente, o X na posição 143 é H ou ausente, o X na posição 144 é K ou ausente, o X na posição 145 é R ou ausente, o X na posição 146 é D ou ausente, o X na posição 147 é P ou ausente, o X na posição 148 é Y ou ausente, o X na posição 149 é T ou ausente, o X na posição 150 é N ou ausente, o X na posição 151 é M ou ausente, o X na posição 152 é T ou ausente, o X na posição 153 é P ou ausente, o X na posição 154 é D ou ausente, o X na posição 155 é E ou ausente, o X na posição 156 é V ou ausente, o X na posição 157 é A ou ausente, o X na posição 158 é E ou ausente, o X na posição 159 é G ou ausente, o X na posição 160 é L ou ausente, o X na posição 161 é R ou ausente e o X na posição 162 é S ou ausente.

[00108] Além disso, um alinhamento da SEQ ID NO: 21 (na sua maioria sequência derivada de *Toxocara canis*, com a única exceção sendo o resíduo de metionina do terminal N) para SEQ ID NO: 20 (sequência derivada de *Toxocara cati*) é mostrado na figura 11. Como o anticorpo produzido contra um polipeptídeo possuindo a sequência correspondente à SEQ ID NO: 21 foi útil na detecção de *Toxocara cati*, é contemplado, adicionalmente, que o polipeptídeo da presente invenção pode possuir sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 21, em que o X na posição 1 é ausente ou M, o X na posição 2 é ausente ou L, o X na posição 3 é ausente ou S, o X na

posição 4 é ausente ou V, o X na posição 5 é ausente ou L, o X na posição 6 é ausente ou A, o X na posição 7 é ausente ou L, o X na posição 8 é ausente ou F, o X na posição 9 é ausente ou A, o X na posição 10 é ausente ou L, o X na posição 11 é ausente ou I, o X na posição 12 é ausente ou T, o X na posição 13 é ausente ou F, o X na posição 14 é ausente ou A, o X na posição 15 é ausente ou V, o X na posição 16 é M ou A, o X na posição 17 é G ou D, o X na posição 19 é E ou K, o X na posição 42 é N ou D, o X na posição 66 é N ou D, e o X na posição 132 é E ou A.

[00109] Um polipeptídeo da presente invenção pode possuir a sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 38, em que o aminoácido na posição 54 é E ou A. Os anticorpos que se ligam especificamente a este polipeptídeo estão incluídos na invenção.

[00110] Como os primeiros 38 resíduos de aminoácidos do polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos que corresponde à SEQ ID NO: 34 não foram derivados de *Ancylostoma* (isto é, são sequência do vetor), é ainda contemplado que o peptídeo da presente invenção pode incluir uma sequência de aminoácidos que é idêntica ou homóloga a uma sequência representada pela SEQ ID NO: 34, em que o X na posição 1 é M ou ausente, o X na posição 2 é G ou ausente, o X na posição 3 é S ou ausente, o X na posição 4 é S ou ausente, o X na posição 5 é H ou ausente, o X na posição 6 é H ou ausente, o X na posição 7 é H ou ausente, o X na posição 8 é H ou ausente, o X na posição 9 é H ou ausente, o X na posição 10 é H ou ausente, o X na posição 11 é S ou ausente, o X na posição 12 é S ou ausente, o X na posição 13 é G ou ausente, o X na posição 14 é L ou ausente, o X na posição 15 é V ou ausente, o X na posição 16 é P ou ausente, o X na posição 17 é R ou ausente, o X na posição 18 é G ou ausente, o X na posição 19 é S ou ausente, o X na posição 20 é H ou ausente, o X na posição 21 é M ou ausente, o X na posição 22 é A ou

ausente, o X está na posição 23 é S ou ausente, o X na posição 24 é M ou ausente, o X na posição 25 é T ou ausente, o X na posição 26 é G ou ausente, o X na posição 27 é G ou ausente, o X na posição 28 é Q ou ausente, o X na posição 29 é Q ou ausente, o X na posição 30 é M ou ausente, o X na posição 31 é G ou ausente, o X na posição 32 é R ou ausente, o X na posição 33 é G ou ausente, o X na posição 34 é S ou ausente, o X na posição 35 é E ou ausente, o X na posição 36 é F ou ausente, o X na posição 37 é E ou ausente, e o X na posição 38 é L ou ausente. Além disso, como o S na posição 251 na SEQ ID NO: 33 foi artificialmente substituído durante o processo de clonagem descritos na seção de Exemplo aqui nessa sequência (a proteína ASP5 de *Ancylostoma* do tipo selvagem inclui um resíduo C nessa posição), é contemplado que o X na posição 251 da SEQ ID NO: 34 pode ser ou S ou C.

[00111] É também contemplado que uma ou mais das 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 e SEQ ID NO: 34 podem ser apenas uma parte de uma sequência de polipeptídeos maior, e, portanto, pode representar a sequência parcial de uma ou mais proteínas que normalmente são expressas em ascarídeo, por exemplo, uma ou mais sequências de polipeptídeos que são artificialmente fundidas à 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 ou SEQ ID NO: 38 ou Copro6728. O versado na técnica reconhecerá que há uma variedade de técnicas existentes para fundir artificialmente dois ou mais fragmentos de polipeptídeos juntos.

[00112] É mais contemplado ainda que o polipeptídeo da presente invenção pode incluir mais de uma das 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, SEQ ID NO: 38, e Copro6728. Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode incluir a 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 ou SEQ ID NO: 38 ou Copro6728. Além disso, é contemplado que o polipeptídeo da presente invenção pode incluir uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondentes à 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 ou SEQ ID NO: 38 ou Copro6728. Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode ser formado por uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondentes às SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21 ou

SEQ ID NO: 28, que são fundidos juntos. Em um outro exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode ser formado por uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondentes à SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21 ou SEQ ID NO: 28 e uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondentes à SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 23 ou SEQ ID NO: 30 que são fundidas juntas em qualquer combinação.

[00113] Considerando que um determinado polipeptídeo da presente invenção foi expresso e isolado por uma técnica específica (na qual é descrita na seção de Exemplo incluída aqui), o versado na técnica reconhecerá que qualquer um dos polipeptídeos da presente invenção podem ser isolados pelo emprego de qualquer um ou mais de uma variedade de técnicas. (Vide, por exemplo, Sewald e 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 Peptides Synthesis*, Oxford University Press (2002), cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade). Estas técnicas incluem aquelas que podem ser realizadas para isolar os polipeptídeos naturalmente existentes possuindo sequência de aminoácidos correspondente às 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 N.O: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, e Copro6728 e qualquer variante de ocorrência natural desses polipeptídeos. Estas técnicas incluem ainda aquelas que podem ser realizadas para gerar artificialmente os polipeptídeos possuindo sequência de aminoácidos correspondente às 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, SEQ ID NO: 38, e Copro6728 e qualquer variante conservadora desses polipeptídeos. Tais variantes podem ser geradas, por exemplo, pelo emprego de qualquer uma ou mais técnicas de mutagênese ou por síntese direta.

[00114] Os polipeptídeos da presente invenção são capazes de induzir uma resposta imune em um animal hospedeiro, que é exposto a esses polipeptídeos para produzir um ou mais dos anticorpos da presente invenção. Independentemente da técnica pela qual são derivados, os polipeptídeos da presente invenção são preferivelmente preparados em forma substancialmente pura quando são utilizados com a finalidade de produzir o anticorpo. Preferencialmente, estes polipeptídeos são, pelo menos, cerca de 80% puro, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90 a 95% puro, e mais preferivelmente ainda pelo menos cerca de 99% puro. As técnicas exemplares para induzir uma resposta imune em um organismo hospedeiro e para isolar os anticorpos dos mesmos são descritos a seguir, mas é preciso entender que a presente invenção não se limita a essas técnicas. O versado na técnica reconhecerá que há uma pluralidade de técnicas para atingir esse mesmo objetivo sem se desviar do escopo e do espírito da invenção.

IV. OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO

[00115] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, que são produzidos contra e que se ligam especificamente à totalidade ou parte de um ou mais polipeptídeos da presente invenção, e também inclui composições que

incluem os referidos anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Quando contatado para uma amostra obtida de um mamífero, esses anticorpos e fragmentos de ligação de antígenos são capazes de ligarem, especificamente, a um determinado antígeno do verme de helminto. Por exemplo, os anticorpos de ascarídeo e os fragmentos de ligação de antígenos são capazes de se ligarem, especificamente, aos antígenos de ascarídeo presentes na amostra, mas não são capazes de se ligarem, especificamente, a qualquer antígeno de ancilostomídeo ou de tricurídeo que podem estar presentes na amostra. Como um exemplo ainda, os anticorpos de tricurídeo e os fragmentos de ligação de antígenos são capazes de se ligarem, especificamente, aos antígenos de tricurídeo presentes na amostra, mas não são capazes de se ligarem especificamente a qualquer antígeno de ancilostomídeo ou de tricurídeo que podem estar presentes na amostra. Os anticorpos da presente invenção são adequados para serem utilizados apenas para capturar um ou mais antígenos de ascarídeo, antígenos de tricurídeo e/ou antígenos de ancilostomídeo, apenas para detectar um ou mais antígenos de ascarídeo, antígenos de tricurídeo e/ou antígenos de ancilostomídeo, ou, mais preferivelmente, para tanto capturar quanto detectar um ou mais antígenos de ascarídeo, antígenos de tricurídeo e/ou antígenos de ancilostomídeo.

[00116] Os anticorpos da presente invenção podem pertencer a qualquer classe de anticorpo, incluindo, por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e pode ser preparado por qualquer de uma variedade de técnicas conhecidas pelo versado na técnica. (Vide, por exemplo, 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 and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* , Cold Spring Harbor Laboratory (1988); and *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* , Howard and Kaser, eds., CRC Press (2006), cada uma das quais é incorporada aqui por referência na sua totalidade).

[00117] Em uma técnica, o polipeptídeo da invenção é introduzida em um animal hospedeiro, tal como, por exemplo, no coelho, camudongo, rato, porquinho da Índia, cabra, porco, vaca, carneiro, burro, cachorro, gato, galinha ou cavalo. Uma resposta imune aumentada pode ser provocada no animal hospedeiro através da associação do polipeptídeo com um carreador e/ou através da exposição do hospedeiro a um adjuvante, mas é preciso entender que a presente invenção não exige que o polipeptídeo esteja associado a um carreador ou que o hospedeiro deva ser exposto ao adjuvante. Um carreador exemplar que pode ser utilizado para este fim é a albumina de soro bovino, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Os adjuvantes exemplares incluem o adjuvante completo ou incompleto de Freund e o adjuvant MDL-TDM. Independentemente de se o polipeptídeo está associado com o referido carreador, ou se o hospedeiro é exposto a um adjuvante, os intensificadores das imunizações podem ser feitos, opcionalmente, com o animal hospedeiro sendo sangrado uma ou mais vezes depois disso. Os anticorpos policlonais que se ligam especificamente ao polipeptídeo podem então ser purificados a partir de soros obtidos a partir do sangramento ou hemorragias. Tal purificação pode ser obtida, por exemplo, pelo emprego de técnicas de cromatografia de afinidade que envolvem a associação do polipeptídeo a um suporte sólido. Tais técnicas de cromatografia de afinidade são bem conhecidas pelo versado na técnica.

[00118] Em várias modalidades, o anticorpo de ascarídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em um coelho através da imunização no animal hospedeiro, com o polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácido correspondente à SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO : 21 (daqui por diante, esses determinados anticorpos são referidos como "anti-DIV6744", "anti-DIV6716" e "anti-DIV6728, respectivamente). O versado na técnica irá reconhecer que a produção e o isolamento de anti-DIV6744, anti-DIV6716 e anti-DIV6728, ou qualquer outro anticorpo da presente invenção, não se limita a nenhuma técnica específica.

[00119] Em uma outra modalidade, o anticorpo de ascarídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em um coelho através da imunização do animal hospedeiro com um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácido correspondente ao 6728C (SEQ ID NO: 38). (daqui por diante, esse determinado anticorpo será referido como "anti-Copro6728C".) Uma técnica específica para a produção e o isolamento desse anticorpo é descrita aqui na seção de Exemplo, mas o versado na técnica irá reconhecer que a produção e o isolamento de anti-Copro6728C não se limita a essa técnica específica.

[00120] Em modalidades adicionais, o anticorpo de ascarídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em um coelho através da imunização do animal hospedeiro com extrato de ascarídeo completo, extrato de ascarídeo do intestino ou extrato de ascarídeo de órgãos reprodutores, tal como descrito no Pedido de Patente Nº de Série 11/763.592, intitulada "*Roundworm Coproantigen Detection*", depositado em 15 de junho de 2007.

[00121] Em uma modalidade ainda, o anticorpo de tricurídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em coelhos através da imunização do animal hospedeiro com o polipeptídeo possuindo a

sequência de aminoácidos correspondente às SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7 (Daqui por diante, este determinado anticorpo é referido como "anti-DIV6901" ou "anti-DIV6902"). O versado na técnica irá reconhecer que a produção e o isolamento de anti-DIV6901, anti-DIV6901 ou qualquer outro anticorpo da presente invenção, não se limita a qualquer técnica específica.

[00122] Em uma outra modalidade, um anticorpo de ancilostomídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em coelho através da imunização do animal hospedeiro com o polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 34. (Daqui por diante, este determinado anticorpo é referido como "anti-Asp5-1"). O versado na técnica irá reconhecer que a produção e o isolamento de anti-Asp5-1, ou qualquer outro anticorpo da presente invenção, não está limitado a qualquer técnica específica.

[00123] Em uma modalidade adicional, o anticorpo de ancilostomídeo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em coelhos através da imunização do animal hospedeiro com o polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácidos correspondente à SEQ ID NO: 33, ou seja, substancialmente com a proteína ASP5 de comprimento total do ancilostomídeo, conforme descrito no Pedido de Patente Nº de Série 11/763.583, intitulado "*Device, Kit and Method for Hookworm Antigen Detecion*", depositado em 15 de junho de 2007.

[00124] Em outras modalidades, os anticorpos da presente invenção são produzidos em um hospedeiro contra um ou mais polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora da sequência correspondente às SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO: 28 e SEQ ID NO: 34. Em algumas outras modalidades, os anticorpos da presente invenção são produzidos em um hospedeiro contra qualquer um ou mais dos polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos

correspondentes às SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 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: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, Copro6728 e CoproAP5, ou a um ou mais polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora de qualquer uma dessas sequências.

[00125] Em uma outra modalidade, os anticorpos da presente invenção são anticorpos que ligam, especificamente, um ou mais polipeptídeos possuindo a sequência de aminoácidos correspondente à 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, SEQ ID NO: 38, Copro6728 ou CoproAP5, ou partes antigenicas das mesmas.

[00126] Em ainda outras modalidades, os anticorpos da presente invenção ligam, especificamente, um ou mais polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora da sequência correspondente à SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 28 ou SEQ ID NO: 34. Em algumas outras modalidades, os anticorpos da presente invenção ligam especificamente, um ou mais polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos correspondentes à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 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: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33,

SEQ ID NO: 38, Copro6728 ou CoproAP5, ou um ou mais polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora de qualquer uma dessas sequências.

[00127] Também é preciso entender que os anticorpos da invenção, opcionalmente, podem ser anticorpos mono ou policlonais, anticorpos de cadeia simples (scFv), anticorpos quiméricos e fragmentos dos mesmos. Os anticorpos monoclonais que são específicos para o polipeptídeo de interesse podem ser obtidos e purificados, por exemplo, através da preparação de linhas de células que produzem anticorpos possuindo a especificidade desejada para o polipeptídeo de interesse. As linhas celulares desse tipo podem ser derivadas de células de um tipo específico (por exemplo, células do baço), que são isoladas a partir de um animal hospedeiro que foi previamente imunizado com o polipeptídeo, como descrito anteriormente. Nesse caso, essas células poderiam então, por exemplo, ser imortalizadas, através da fusão delas com células de mieloma através da realização de qualquer um de uma variedade de técnicas de fusão conhecidas pelo versado na técnica. Em uma técnica exemplar, as células do animal hospedeiro imunizado são coincubadas com o seu parceiro de fusão, por exemplo, as células de mieloma, na presença de um detergente, por um período curto de tempo antes de serem semeadas em um meio que suporta o crescimento das células híbridas (mas não o parceiro de fusão de mieloma). Tal seleção pode ser alcançada utilizando, por exemplo, hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Quando as células híbridas surgem durante a seleção, talvez em uma ou duas semanas após o início do processo de seleção, as colônias híbridas simples (e seus sobrenadantes) são testadas por sua capacidade de se ligar ao polipeptídeo ou aos polipeptídeos contra o qual o animal hospedeiro foi imunizada. As colônias híbridas possuindo a especificidade de ligação mais ideal representariam os

melhores candidatos a partir do qual os anticorpos monoclonais podem ser isoladas. Estes anticorpos monoclonais, por exemplo, podem ser isolados diretamente do sobrenadante (isto é, meio) em que essas colônias são cultivadas, empregando qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas pelo versado na técnica.

[00128] Os anticorpos da invenção também podem ser um anticorpo de cadeia simples (scFv) ou um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo. Os fragmentos de ligação de antígenos dos anticorpos são uma parte de um anticorpo intacto, que compreende o sítio de ligação do antígeno ou uma região variável de um anticorpo intacto, em que a parte está livre dos domínios de cadeia pesada consante da região Fc do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ e fragmentos Fv. Além da produção e da purificação de animais ou células de mamíferos, os anticorpos, os fragmentos de anticorpos ou as estruturas de anticorpos não podem ser selecionadas com base em várias tecnologias *in vitro*, incluindo exposição do fago, exposição ribossomal ou exposição bacteriana.

[00129] Os anticorpos, incluindo os anticorpos secundários, podem ser marcados com qualquer tipo de rótulo conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, os rótulos fluorescentes, de quimioluminescência, radioativos, de enzimas, de partículas coloidais, radioisótopos e bioluminescentes. Em várias modalidades da invenção, um ou mais dos anticorpos da invenção são marcados com uma enzima, uma partícula coloidal, um radionuclídeo ou fluoróforo. O rótulo de partículas pode ser, por exemplo, uma partícula de látex colorido, sol de corante, ou sol de ouro conjugado a um anticorpo.

MÉTODOS, DISPOSITIVOS E KITS DA INVENÇÃO

DISPOSITIVOS E KITS DA INVENÇÃO

[00130] A presente invenção, em um aspecto, detecta a presença

ou a ausência de um ou mais antígenos de helmintos de uma amostra, o dispositivo compreendendo um suporte sólido, em que o suporte sólido, imobiliza nele, pelo menos, dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em: (a) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ascarídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo; (b) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de tricurídeo, mas não um coproantígeno de ascarídeo ou de ancilostomídeo; e (c) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não um coproantígeno de tricurídeo ou de ancilostomídeo; e opcionalmente, (d) um ou mais tipos de coproantígeno de ascarídeo, coproantígeno de tricurídeo e/ou coproantígeno de ancilostomídeo, em que um ou mais tipos de coproantígeno de ascarídeo, coproantígeno de tricurídeo e coproantígeno de ancilostomídeo são ligados, especificamente, aos anticorpos. O dispositivo é arranjado para, especificamente, ajudar a ligar e isolar os coproantígenos de helmintos de ascarídeo, de tricurídeo e de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero.

[00131] Em um aspecto, o dispositivo inclui um suporte sólido, em que um ou mais anticorpos da invenção são imobilizados no suporte sólido. O suporte sólido pode ser, mas não se limita a ser, a superfície interior ou inferior de uma cavidade de uma placa de microtítulo ou um substrato que é incluído, por exemplo, como parte de um dispositivo de fluxo lateral. Uma placa de microtítulo exemplar é uma Placa Immulon 1B de 96 poços (que está disponível comercialmente pela Thermo Scientific de Milford, MA), mas é preciso entender que o versado na técnica irá reconhecer que uma grande variedade de outras placas de microtítulo, que não é a Placa Immulon 1B de 96 poços, permite a imobilização dos mesmos anticorpos nela e, portanto, seria adequado para fornecer o suporte sólido da presente invenção.

[00132] Um dispositivo de fluxo lateral exemplar é o dispositivo de fluxo lateral que é descrito na Patente U.S. Nº 5.726.010, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade. O dispositivo para a realização de um teste de fluxo lateral pode ser um dispositivo SNAP®, que está disponível comercialmente pelo IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME. No entanto, é preciso entender que o versado na técnica irá reconhecer que uma grande variedade de outros dispositivos de fluxo lateral, que não é o dispositivo SNAP® ou o descrito pela Patente U.S. Nº 5.726.010, permite a imobilização de um anticorpo nele e, portanto, seria adequado para ser usado como o dispositivo da presente invenção. Estes dispositivos podem incluir, por exemplo, os dispositivos de fluxo lateral que utilizam a tecnologia de ouro coloidal.

[00133] Os anticorpos utilizados no dispositivo da invenção podem ser imobilizados no suporte sólido por qualquer metodologia conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, covalente ou não covalentemente, direta ou indiretamente, fixando os anticorpos no suporte sólido. Portanto, enquanto estes anticorpos podem ser fixados ao suporte sólido por adsorção física (ou seja, sem o uso de ligantes químicos), também é verdade que estes anticorpos podem ser imobilizados no suporte sólido por qualquer método de ligação química (isto é, com o uso de ligantes químicos) facilmente reconhecidos por um versado na técnica.

[00134] Também é preciso entender que o suporte sólido pode ser de qualquer material adequado para a imobilização dos anticorpos da invenção. Por exemplo, o suporte sólido pode ser contas, partículas, tubos, cavidades, sondas, hastes, pontas de pipetas, lâminas, fibras, membranas, papéis, celuloses naturais e modificados, poliacrilamidas, agaroses, vidro, polipropileno, polietileno, poliestireno dextrano, náilon, amilases, plásticos, magnetita ou qualquer outro material adequado

facilmente reconhecido por um versado na técnica.

[00135] O dispositivo pode incluir, opcionalmente, um ou mais reagentes de captura de antígeno marcados, que podem ser misturados com uma amostra de um mamífero, antes da aplicação de um dispositivo da invenção. Quando o reagente de captura de antígeno marcado está incluído, o reagente de captura de antígeno marcado pode ou não ser depositado ou seco na superfície sólida do dispositivo. "Reagente de captura de antígeno" refere-se a um composto que é específico para o antígeno ou os antígenos de interesse. O reagente de captura de antígeno marcado, se adicionado à amostra de mamíferos ou pré-depositado no dispositivo, pode ser, por exemplo, um anticorpo marcado específico para um antígeno de ascarídeo, incluindo mas não limitado, aos anticorpos da presente invenção. Em um exemplo, um anti-DIV6744 conjugado com a peroxidase do rábano silvestre pode ser usado como um reagente de captura de antígeno marcado. Em um outro exemplo, um anti-DIV6901 ou um anti-DIV6902 conjugado com a peroxidase de rábano-silvestre pode ser usado como um reagente de captura de antígeno marcado. Em um exemplo adicional, um anti-DIV6716 conjugado com peroxidase de rábano-Silvestre pode ser usado como um reagente de captura de antígeno marcado. Em um exemplo adicional, um anti-DIV6728 conjugado com a peroxidase de rábano-silvestre pode ser usada como um reagente de captura de antígeno marcado. Em mais um exemplo ainda, um anti-Copro6728 conjugado com a peroxidase de rábano-silvestre pode ser usado como um reagente de captura de antígeno marcado.

[00136] O dispositivo também pode incluir, opcionalmente, um reagente líquido que transporta (tal como quando o dispositivo é um dispositivo SNAP®, por exemplo), ou, de outro modo, facilita a remoção do (tal como quando o dispositivo inclui uma placa de

microtítulo, por exemplo) material não ligado (por exemplo, as partes que não reagidas da amostra de mamíferos, tais como, por exemplo, as partes não reagidas do extrato das fezes e de reagente de captura de antígeno não ligado) fora da zona de reação (fase sólida). O reagente líquido pode ser um reagente de lavagem e serve apenas para remover o material não ligado da zona de reação, ou pode incluir um reagente detector e servir tanto para remover o material não ligado quanto para facilitar a detecção do antígeno. Por exemplo, no caso de um reagente de captura de antígeno conjugado a uma enzima, o reagente detector inclui um substrato que produz um sinal detectável em cima da reação com o conjugado do anticorpo da enzima na zona de reação (fase sólida). Alternativamente, no caso de um reagente de captura de antígeno marcado a uma molécula de absorção leve, fluorescente ou radioativa, o reagente líquido age, meramente, como uma solução de lavagem que facilita a detecção da formação complexa na zona reativa através da lavagem para longe do reagente marcado não ligado.

[00137] O reagente líquido pode incluir ainda uma quantidade limitada de um "inibidor", ou seja, uma substância que bloqueia o desenvolvimento do produto final detectável. A quantidade limitada é definida como sendo uma quantidade suficiente de inibidor para bloquear o desenvolvimento do produto final até que a maioria, ou todos os excessos, do material não ligado sejam transportados para longe da segunda região, momento em que produto final detectável é produzido.

[00138] O dispositivo da presente invenção também pode incluir vários reagentes de ligação imobilizados em locais distintos do reagente ou reagentes de captura de antígeno. Por exemplo, um imunorreagente (um anticorpo, um antígeno ou um polipeptídeo) que reconhece uma parte de anticorpo de espécie específica (por exemplo,

o ascarídeo específico) de um anticorpo marcado ou um reagente de captura de antígeno, ou uma parte reagente de uma enzima rotulada, pode ser incluído como um controle positivo para avaliar a viabilidade dos reagentes dentro do dispositivo. Por exemplo, um controle positivo pode ser um anticorpo de antiperoxidase de rábano-silvestre que foi produzido, por exemplo, em uma cabra ou um rato. Além disso, um reagente, por exemplo, um anticorpo, isolado de um membro não imunológico das espécies a partir da qual a parte do anticorpo do complexo antígeno-anticorpo foi derivada, pode ser incluído como um controle negativo para avaliar a especificidade da formação de imunocomplexos (ou seja, o complexo antígeno-anticorpo).

[00139] Além de ser projetado para, especificamente, ligar e isolar os coproantígenos de helmintos de ascarídeo, tricurídeos e ancilostomídeos em uma amostra de mamíferos, o dispositivo da invenção pode, opcionalmente, ser projetado para permitir que um ou mais testes de diagnóstico sejam realizados. Por exemplo, o suporte sólido pode também incluir os reagentes para a detecção de um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias. Os reagentes para a detecção de um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias podem ser, por exemplo, um ou mais anticorpos ou um ou mais antígenos reconhecidos pelos anticorpos específicos para um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

[00140] Em uma modalidade, o dispositivo da presente invenção é uma placa de microtítulo que inclui uma pluralidade de cavidades, em que cada cavidade inclui um suporte sólido possuindo pAB anti-DIV6744 imobilizado nele.

[00141] A placa pode ser usada em conjunto com um método da presente invenção para detectar a presença ou a ausência de um ou

mais coproantígenos de helmintos em uma amostra. Por exemplo, uma infecção por ascarídeo pode ser diagnosticada em um mamífero através da detecção de um ou mais antígenos de ascarídeo com o pAB anti-DIV6744, um ou mais antígenos de tricurídeo com o pAB anti-DIV6902 e um ou mais antígenos de ancilostomídeo com o pAB anti-Asp5-1, que é imobilizado no suporte sólido. Em uma modalidade, os antígenos que são detectados são coproantígenos. "Coproantígenos" são qualquer produto ou produtos de ascarídeo, tricurídeo ou ancilostomídeo que estão presentes em uma amostra de fezes e que podem se ligar especificamente aos anticorpos. Os coproantígenos, portanto, podem ser vermes completos, ovos completos, fragmentos completos ou produtos secretados, excretados ou eliminados do verme ou em uma combinação dos mesmos. Os coproantígenos adicionais incluem, por exemplo, os polipeptídeos da presente invenção, tais como os polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos correspondente à 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 ou SEQ ID NO: 38, polipeptídeos possuindo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora dessas sequências, e/ou fragmentos antigênicos de quaisquer dos tais polipeptídeos e CoproASP5 e Copro6728.

[00142] A invenção inclui ainda kits de ensaio (por exemplo, artigos de fabricação) para detectar e distinguir entre o ascarídeo, o tricurídeo e/ou o ancilostomídeo em uma amostra de mamíferos. Um kit, portanto, pode incluir um ou mais dispositivos e/ou composições da presente invenção. Por exemplo, o kit pode incluir anticorpos

antiascarídeo e os meios para determinar a ligação dos anticorpos aos antígenos de ascarídeo, anticorpos de antitricurídeo e os meios para determinar a ligação dos anticorpos aos antígenos de tricurídeo e anticorpos de antiancilogostomídeo e meios para determinar a ligação dos anticorpos aos antígenos de ancilogostomídeo na amostra. Em um determinado exemplo, tal como um kit inclui o dispositivo possuindo um anticorpo de anti-ascarídeo imobilizado, tal como anti-DIV6744, um anticorpo antitricurídeo, tal como anti-DIV6902, e um anticorpo antiancilogostomídeo, tal como anti-Asp5-1, por exemplo, um ou mais reagentes de antígenos de captura (por exemplo, um reagente de captura de antígeno não imobilizado marcados e um reagente de captura de antígeno imobilizado) e reagente de lavagem, bem como o reagente de detetor e reagentes de controle positivo e negativo, se desejado ou necessário. Outros componentes tais como tampões, controles, e similares, conhecidos por aqueles versados na técnica, podem ser incluídos em tais kits de teste. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas, para fornecer para as concentrações na solução dos reagentes que otimizam substancialmente a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos na forma de pó seco, geralmente liofilizado, aos quais na dissolução proporcionará uma solução reagente possuindo as concentrações adequadas para combinar com uma amostra. O presente kit pode ainda incluir instruções para a realização de um ou mais métodos da presente invenção, incluindo as instruções para uso de qualquer dispositivo e/ou composição da presente invenção que está incluído no kit.

B. MÉTODOS DA INVENÇÃO

[00143] A presente invenção também inclui métodos para usar um ou mais dos dispositivos, kits e/ou composições da presente invenção para detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de

helminthos em uma amostra. Os métodos, portanto, podem ser realizados para detectar a presença ou a ausência de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo em uma amostra, tais como, por exemplo, uma amostra de fezes, que são obtidos a partir de um mamífero, incluindo, mas não limitado a, um canino, felino, suíno, bovino e seres humanos. Além disso, os métodos podem ser realizados, porexemplo, para detectar *Toxocara*, tais como *T. canis* ou *T. cati* ou *T. vitulorum*, *Ascaris*, tais como *A. lumbricoides* ou *A. suum*, *Anisakis*, tais como *A. simplex*, *Pseudoterranova*, tais como *P. decipiens*, *Trichuris* e/ou *Trichocephalus*, tais como *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura* e *Trichuris discolor* e *Trichocephalus trichiuris*, *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *ceylanicum Ancylostoma*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Ancylostoma pluridentatum*, *Necator americanus* e *Uncinaria stenocephala*.

[00144] Nos métodos da presente invenção, a detecção de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo pode ser realizada pela detecção da presença ou da ausência de um ou mais antígenos de ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo, tais como Copro6728 e CoproASP5 ou os polipeptídeos possuindo um sequência de aminoácido correspondente à 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 ou SEQ ID NO: 38, bem como os fragmentos antigênicos e/ou as variantes conservadoras destas sequências, e CoproASP5, por exemplo. Quando a amostra em teste para os coproantígenos de helmintos é fezes, a porção solúvel das fezes pode

ser coletada por qualquer protocolo conhecido na técnica. Por exemplo, além do protocolo específico descrito na seção de exemplos aqui, as porções solúveis da amostra geralmente podem ser coletadas por meio da filtração, extração, centrifugação ou simples mistura seguidas pela fixação gravimétrica. O versado na técnica irá reconhecer que há uma variedade de formas de extração e preparação de amostras não fecais de um mamífero também. Por exemplo, a amostra pode ser um fluido corporal que é naturalmente eliminado ou de outra maneira liberado pelo mamífero, ou que é artificialmente obtida do mamífero. Tal extração artificial pode ser realizada através da ordenha do mamífero ou através da injeção de uma seringa no mamífero e extração do fluido dentro da seringa. Uma vez obtido, o fluido pode ser, opcionalmente, fracionado (por exemplo, o soro pode ser fracionado a partir do sangue total, em seguida, usado como exemplo). Como um outro exemplo, a amostra pode ser obtida através da raspagem do mamífero, tal como a cavidade oral do mamífero, por exemplo. Como um outro exemplo ainda, os cortes dos tecidos podem ser obtidos através de biópsia.

[00145] Os métodos incluem contatar a amostra de mamífero com um ou mais anticorpos específicos para coproantígenos de helmintos sob condições que permitam formar um complexo antígeno/anticorpo complexo, ou seja, um imunocomplexo. Ou seja, um anticorpo se liga especificamente a um coproantígeno presente na amostra. O versado na técnica é familiarizado com os ensaios e as condições que podem ser usadas para detectar o complexo de ligação antígeno/anticorpo. Por exemplo, o complexo antígeno/anticorpo pode ser detectado usando um anticorpo secundário que se liga ao complexo antígeno/anticorpo. A formação de um complexo entre antígenos e anticorpos na amostra pode ser detectada usando qualquer método adequado conhecido na técnica.

[00146] Além disso, a quantidade relativa dos complexos antígeno-anticorpo que são formados em uma determinada reação, pode ser medida com relação aos formados em qualquer outra reação através de qualquer metodologia conhecida na técnica de alcançar o objetivo. Quando é determinado que uma amostra sob teste tem os complexos antígeno-anticorpo específicos (ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo), pode-se concluir que, com base nos complexos específicos formados, um helminto específico está presente no mamífero hospedeiro, e que o helminto está presente (ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo). Quando isso for verdade, pode-se concluir que o mamífero, a partir do qual a amostra foi obtida, apresenta uma infecção intestinal por helmintos. As conclusões de que o mamífero que está sendo testado apresenta uma infecção intestinal por helmintos podem ser feitas por um clínico em uma clínica de serviços de diagnóstico ou pelo profissional de saúde do mamífero, tal como o veterinário do mamífero, por exemplo. Quando o profissional de saúde de um mamífero determina (ou, de outra maneira informou que) um mamífero apresenta uma infecção por helmintos e que o helminto está presente, o profissional de saúde pode, então, sujeitar o mamífero a um curso de tratamento que é otimizado para livrar o mamífero dos helmintos especificamente, ao invés de uma infecção de nematoides parasitas em geral. Além disso, a presente invenção pode ser usada para confirmar que qualquer animal que recebeu tratamento para uma infecção de helminto específica foi livrado da infecção. Um profissional de saúde que descobre que uma amostra inclui tanto o ascarídeo quanto o tricurídeo, mas não o ancilostomídeo, por exemplo, poderia usar esse conhecimento para tratar os mamíferos a partir do qual a amostra foi colhida especificamente para ascarídeo através da administração ao mamífero de um fármaco plenamente eficaz contra ascarídeo e um segundo fármaco plenamente eficaz contra tricurídeo.

Sem tal conhecimento, o profissional de saúde pode, por exemplo, tratar de outra maneira o mamífero através de um fármaco que é plenamente eficaz contra ascarídeo somente, tricurídeo somente ou nem ascarídeo quanto tricurídeo (em tais casos, o mamífero estaria sob risco de receber tratamento subótimo). Além disso, os seres humanos que podem entrar em contato com o animal infectado ou suas excreções devem ser aconselhados a tomar precauções contra a aquisição do parasita ou parasitas. Neste contexto, é importante determinar as espécies de verme com alta especificidade, pois alguns helmintos, tais como os ascarídeos e os ancilostomídeos, podem causar doenças significativas (por exemplo, a larva de migrans) em seres humanos, embora seja geralmente aceito que o tricurídeo não desempenha um papel de importância zoonótica em seres humanos.

[00147] As etapas do método da presente invenção podem incluir a aplicação de uma amostra de mamíferos a um dispositivo da invenção, que inclui um primeiro anticorpo capaz de se ligar, especificamente, a um coproantígeno de ascarídeo, mas não a um coproantígeno de tricurídeo ou ancilostomídeo; um segundo anticorpo capaz de se ligar, especificamente, a um coproantígeno de tricurídeo, mas não a um coproantígeno de ascarídeo ou ancilostomídeo; e um terceiro anticorpo capaz de se ligar, especificamente a um coproantígeno de ancilostomídeo, mas não a um coproantígeno de tricurídeo ou ancilostomídeo para formar os complexos de anticorpo de coproantígenos na presença dos coproantígenos, se houver, na amostra; e detectar a presença ou a ausência dos complexos de anticorpo de coproantígenos, se houver. Os anticorpos específicos para antígenos de ascarídeos pode ser direta ou indiretamente fixados a um suporte sólido ou a um substrato tal como uma cavidade de microtítulo, a porção de anticorpo imobilizada de um dispositivo SNAP®, uma conta magnética, uma conta não magnética, uma

coluna, uma matriz, uma membrana, uma esteira fibrosa composta por fibras sintéticas ou naturais (por exemplo, vidro ou polímeros termoplásticos ou materiais a base de celulose, tais como, polietileno, polipropileno ou poliéster), uma estrutura aglomerada composta de materiais de partículas (por exemplo, vidro ou vários polímeros termoplásticos) ou uma película da membrana fundida composta de nitrocelulose, náilon, polissulfona ou similares (geralmente sintéticos na natureza). Todos estes materiais de substrato podem ser utilizados em formas adequadas, tais como filmes, folhas ou placas, ou podem ser revestidos ou ligados ou laminados carreadores inertes apropriados, tais como papel, vidro, filmes plásticos ou tecidos. Os métodos mais adequados para a imobilização dos peptídeos na fase sólida incluem as interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes e similares.

[00148] Os métodos da presente invenção não exigem, no entanto, a utilização das fases sólidas ou substratos. O versado na técnica irá reconhecer que há uma variedade de maneiras em que o presente método pode ser realizado para detectar a presença ou a ausência de ascarídeo, sem envolver a utilização das fases sólidas ou substratos. Em apenas um exemplo, os métodos de imunoprecipitação que não exigem a utilização das fases sólidas ou substratos podem ser realizados.

[00149] Em algumas modalidades da invenção, o complexo antígeno/anticorpo é detectado quando um reagente indicador, tal como um conjugado de enzima, que é ligado ao anticorpo, catalisa uma reação detectável. Opcionalmente, um reagente indicador, incluindo um composto de geração de sinal, pode ser aplicado ao complexo antígeno/anticorpo sob condições que permitem a formação de um complexo antígeno/anticorpo/indicador detectável. Opcionalmente, o anticorpo pode ser marcado com um reagente

indicador antes da formação de um complexo antígeno/anticorpo.

[00150] A formação de um complexo antígeno/anticorpo ou de um complexo antígeno/anticorpo/indicador em alguns dos métodos da presente invenção pode ser, especificamente, detectada por métodos radiométricos, colorimétricos, fluorométricos, fotométricos, de separação por tamanho ou de precipitação. A detecção de um complexo antígeno/anticorpo também pode ser feita através da adição de um anticorpo secundário que é acoplado a um reagente indicador incluindo um sinal de geração de compostos. Os reagentes indicadores, incluindo os compostos geradores de sinal (rótulos) associados a um complexo polipeptídeo/anticorpo podem ser detectados utilizando os métodos descritos acima, e podem incluir agentes cromogênicos, catalisadores, tais como conjugados de enzima, compostos fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, compostos quimioluminescentes, tais como dioxetanos, acridínios, fenantridínios, rutênio e luminol, elementos radioativos, rótulos visuais diretos, bem como cofatores inibidores, partículas magnéticas e similares. Exemplos de conjugados enzima incluem a fosfatase alcalina, peroxidase de rábano-silvestre, beta-galactosidase e similares. A escolha de um determinado rótulo, não é crítica, mas será capaz de produzir um sinal ou por si só tanto quanto em conjunto com uma ou mais substâncias adicionais.

[00151] Os métodos da invenção incluem, mas não estão limitados aos com base na concorrência, na reação direta ou ensaios de tipo sanduíche, incluindo, mas não limitado a ensaios por ELISA, RIA, imunofluorescência (IFA), hemaglutinação (HA), imunoensaio de polarização de fluorescência (FPIA) e ensaios de placa de microtítulo (ou seja, qualquer ensaio feito em uma ou mais cavidades de uma placa de microtítulo). Um ensaio da invenção inclui um ensaio de ligação de cromatografia de fluxo reversível, que pode ser realizado

utilizando, por exemplo, um dispositivo SNAP®. Vide Patente US Nº 5.726.010.

[00152] Em algumas modalidades, o método da invenção facilita os ensaios de ligação específicos do tipo sanduíche ou competição. Em um ensaio tipo sanduíche, os reagentes de captura de antígeno são imobilizados em uma zona reativa. Estes reagentes de captura de antígeno podem se ligar, especificamente, aos antígenos de ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo, da amostra que está sendo testada. Após a ligação do antígeno da amostra, o reagente de captura de antígeno e do complexo de antígeno é detectado por qualquer método adequado. Por exemplo, o complexo pode ser reagido com reagentes de ligação específicos marcados (por exemplo, um conjugado do anticorpo da enzima) e o antígeno detectado (por exemplo, a reação com o substrato).

[00153] Em outras modalidades do método da presente invenção, um ensaio de competição é realizado. Em um ensaio de competição, os reagentes de captura de antígeno são imobilizados na zona reativa e são contatados simultaneamente com o antígeno de uma amostra e o antígeno marcado (por exemplo, um conjugado da enzima do antígeno). A quantidade de rótulo detectado na zona reativa é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra.

[00154] Em algumas modalidades do método, os anticorpos específicos para os coproantígenos de ascarídeo, tricurídeo e ancilostomíase são anexados em uma fase sólida ou em um substrato. Uma amostra incluindo, potencialmente, um antígeno de ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo é adicionada ao substrato. Os anticorpos que se ligam especificamente ao ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo são adicionados. Os anticorpos podem ser os mesmos anticorpos utilizados na fase sólida ou podem ser de uma fonte ou espécie diferente. Além disso, esses anticorpos podem ser ligados a

um reagente indicador, tal como um conjugado enzimático. As etapas de lavagem devem ser realizadas antes de cada adição. Um substrato cromóforo ou da enzima pode ser adicionado e as cores podem ser permitidas de desenvolverem-se. A reação de cor pode ser interrompida e as cores podem ser quantificadas utilizando, por exemplo, um espectrofotômetro e/ou a cor pode ser avaliada subjetivamente pelo olho humano.

[00155] Em outras modalidades do método, os anticorpos específicos para os coproantígenos de ascarídeo, tricurídeo e ancilostomíase são fixados em uma fase sólida ou em um substrato. Uma amostra incluindo, potencialmente, um antígeno de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo é adicionado ao substrato. Os segundos anticorpos antiespécies que se ligam especificamente aos coproantígenos são adicionados. Estes segundos anticorpos são de espécies diferentes das dos anticorpos na fase sólida. Os terceiros anticorpos antiespécies que se ligam especificamente aos segundos anticorpos e que não se ligam especificamente aos anticorpos na fase sólida são adicionados. Os terceiros anticorpos podem incluir um terceiro reagente indicador, tal como um conjugado enzimático. As etapas de lavagem podem ser realizadas antes de cada adição. Um substrato cromóforo ou de enzima pode ser acrescentado e as cores podem ser permitidas de desenvolverem-se. A reação de cor pode ser interrompida e as cores podem ser quantificadas utilizando, por exemplo, um espectrofotômetro, e/ou a cor pode ser avaliada subjetivamente a olho humano.

[00156] Em um exemplo específico, o método da presente invenção é realizado em conjunto com um dispositivo que é um dispositivo de ensaio de fluxo lateral através da adição de uma amostra preparada de mamíferos a uma matriz de fluxo do dispositivo em uma primeira região (a zona de aplicação da amostra). A amostra preparada é

executada em uma via de fluxo de fluido através da ação capilar a uma segunda região da matriz de fluxo em que existe um rótulo de partículas capaz de se ligar e formar um primeiro complexo com um antígeno na amostra. O rótulo de partículas pode ser, por exemplo, uma partícula de látex colorida, solução de corante, ou solução de ouro conjugada a um anticorpo específico de um antígeno de ascarídeo. O primeiro complexo é realizado em uma terceira região do fluxo de matriz, em que um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno de ascarídeo é imobilizado em um local distinto. Um segundo complexo é formado entre o anticorpo imobilizado e o primeiro complexo. O rótulo de partícula que faz parte do segundo complexo pode ser diretamente visível a olho humano.

[00157] Cada anticorpo específico de helminto pode ser um reagente de captura de antígeno imobilizado em uma zona de reação (fase sólida). Um segundo reagente de captura de antígeno, ou seja, um segundo anticorpo de helminto específico que foi conjugado com um rótulo, tanto pode ser adicionado à amostra antes que a amostra seja adicionada ao dispositivo quanto o segundo reagente de captura de antígeno pode ser incorporado ao dispositivo. Por exemplo, o reagente de captura de antígeno marcado pode ser depositado e seco em uma via de fluxo de fluido que fornece uma comunicação de fluido entre uma zona de aplicação da amostra e da fase sólida. O contato do reagente de captura de antígeno marcado com a amostra-teste pode resultar na dissolução do reagente de captura de antígeno marcado.

[00158] Em uma modalidade do método da presente invenção, o coproantígeno de helminto específico é detectado através do método ELISA. Os exemplos específicos do método ELISA da presente invenção são descritos na seção de Exemplos incluída aqui. Embora a presente invenção seja descrita com respeito a estes métodos ELISA

específicos é preciso entender, no entanto, que o versado na técnica irá reconhecer que as etapas alternativas, complementares ou de substituição do método ELISA podem ser utilizadas sem se desviarem de seu objetivo básico alcançado através deste método da invenção.

[00159] Na outra modalidade da presente invenção, o coproantígeno de helminto é detectado através da utilização de um dispositivo de fluxo lateral, tal como, por exemplo, um dispositivo SNAP®.

[00160] Além disso, os métodos da invenção para detectar uma infecção por helminto pode ser combinados com outros ensaios diagnósticos para detectar a presença de outros organismos ou condições. Por exemplo, os ensaios da invenção podem ser combinados com reagentes que detectam um ou mais parasitas do verme não fecal, um ou mais vírus, um ou mais fungos, uma ou mais bactérias, um ou mais parasitas transmitidos pelo sangue ou sangue oculto ou a combinação dos mesmos. Através do fornecimento de dois ou mais sítios de ligação únicos em um dispositivo de ensaio único (tal como, por exemplo, dois pontos únicos em um dispositivo de ensaio SNAP®), a presente invenção permite a detecção de dois ou mais organismos em uma única amostra. Em uma modalidade, há três pontos únicos para detectar uma infecção passada ou presente ou a infestação de três organismos (os pontos sendo tanto os reagentes de ligação de antígeno quanto de anticorpo) em uma única amostra (isto é, a mesma amostra é exposta aos três reagentes de captura em um único dispositivo). Em ainda outra modalidade, há quatro pontos únicos para detectar uma infecção passada ou presente ou a infestação de quatro organismos (os pontos sendo tanto os reagentes de ligação de antígeno quanto de anticorpo) em uma única amostra (isto é, a mesma amostra é exposta aos quatro reagentes de captura em um único dispositivo). É para ser entendido, no entanto, que o

mesmo dispositivo pode incluir mais de quatro pontos únicos e/ou permitir a detecção de mais de quatro organismos.

[00161] Os reagentes para detectar um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, ou uma ou mais bactérias podem ser, por exemplo, um ou mais anticorpos ou um ou mais antígenos reconhecidos pelos anticorpos específicos para um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

[00162] O método ainda pode incluir, opcionalmente, a utilização de um ou mais ácidos nucleicos de ascarídeo, de tricurídeo e de ancilostomídeo, incluindo, mas não limitado a, os ácidos nucleicos da presente invenção, para determinar a presença ou a ausência de ascarídeo, de tricurídeo e/ou de ancilostomídeo em uma amostra de mamíferos. Tal utilização destes ácidos nucleicos para determinar a presença de helmintos pode ser realizada antes, após ou concomitantemente com a realização de quaisquer outros aspectos do método, incluindo a detecção de ascarídeo, de tricurídeo e de ancilostomídeos pelo anticorpo. Portanto, em um aspecto, após o ascarídeo, o tricurídeo e/ou o ancilostomídeo serem detectados ou não em uma determinada amostra e o mamífero ao qual amostra foi obtida for diagnosticado como tanto possuindo quanto não possuindo infecção por ascarídeo, tricurídeo e/ou ancilostomídeo, a amostra (ou uma amostra obtida mais tarde do mamífero diagnosticado) pode ser testada pela presença ou ausência de qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos, incluindo qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos da invenção. Qualquer falha para detectar um helminto específico em um determinado mamífero utilizando um ou mais ácidos nucleicos (após o helminto ter sido detectado utilizando um ou mais anticorpos) necessitaria levar em consideração a possibilidade de que os anticorpos detectaram corpoantígenos de helminto antes do

aparecimento do ácido nucleico de helminto detectável na amostra. Em tal caso, o profissional de saúde do mamífero pode optar por ignorar a observação de que o ácido nucleico não conseguiu detectar o helminto e prosseguir com o tratamento do mamífero especificamente para a infecção por helminto com base na observação de que os anticorpos foram, de fato, detectados com helminto. Em outro aspecto, os ácidos nucleicos são usados para determinar a presença ou a ausência de helmintos em um determinado mamífero, e, em seguida, a presença ou a ausência de helmintos é ainda avaliada através da utilização de anticorpos da presente invenção. A detecção de um ou mais ácidos nucleicos de helminto pode ser realizada através da utilização de técnicas de detecção de ácido nucleico conhecidas pelo versado na técnica. Por exemplo, tal detecção pode ser realizada através da realização de uma técnica baseada em PCR, tal como, mas limitada a, por exemplo, uma técnica em tempo real baseada em PCR. As técnicas baseadas em PR exemplares estão descritas, por exemplo, em *"PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)"*, 2ª ed, Bartlett e Stirling, eds, Humana Press (2003), e em Sambrook e Russell, *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[00163] A presente invenção é descrita, especificamente, com referência aos cinco exemplos; no entanto, não deve ser interpretada como sendo limitada a eles.

EXEMPLOS

[00164] Salvo indicados de outra maneira, os seguintes materiais e técnicas foram utilizados para gerar os dados descritos em um ou mais dos exemplos 1 a 4, conforme descrito abaixo.

[00165] Preparação de anticorpo de ascarídeo policlonal. Os anticorpos policlonais "pAB anti-DIV6728" (IgG) foram produzidos em

coelho contra um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácido correspondente à SEQ ID NO: 21, respectivamente, e purificados a partir de soro, através da utilização de métodos-padrão. Resumidamente, os nucleotídeos de pAB anti-DIV6728 76 a 456 da SEQ ID NO: 17 foram clonados na estrutura em um vetor (D8223, que é um derivado do pUC19) para criar o plasmídeo D8245. Especificamente, os 125 aminoácidos da SEQ ID NO: 21 que seguem o resíduo de metionina no terminal da sequência correspondem a uma porção de SEQ ID NO: 19 e são codificados pela porção clonada da SEQ ID NO: 17. No plasmídeo D8245, o resíduo de metionina do terminal N foi codificado pela sequência do vetor na junção deste plasmídeo, onde o vetor foi ligado à sequência clonada da SEQ ID NO: 17.

[00166] A sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 21 foi então clivada do plasmídeo D8245 através da restrição da digestão de exonuclease (NdeI e BamHI) e purificada. Esta sequência purificada foi então ligada ao vetor de expressão linearizado, pET28a, e o construto circular resultante (pTDX198: DIV6728) foi transformado nas células *E. coli* BL21 (DE3). (A sequência completa do inserto foi confirmada através da análise da sequência de DNA). A expressão da proteína de fusão marcada com His foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG nas culturas de *E. coli* transformadas. A proteína recombinante foi solubilizada em ureia a 6M e purificada por afinidade de níquel e cromatografia de troca iônica. (Esta proteína recombinante é, daqui em diante, referida como "rDIV6728".)

[00167] Após rDIV6728 ter sido introduzida em coelhos, o pAB anti-DIV6728 foi purificado a partir do plasma dos coelhos imunizados através do isolamento do anticorpo da IgG pela cromatografia de afinidade da proteína G.

[00168] Preparação de anticorpo de tricurídeo policlonal. O

anticorpo policlonal "pAB anti-DIV6901" (IgG) foi produzido em coelho contra um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácido correspondente à SEQ ID NO:5 e purificado a partir de soro, através da utilização de métodos-padrão. Resumidamente, no caso de pAB anti-DIV6901, os nucleotídeos 89 a 1147 da SEQ ID NO: 1 foram clonados na estrutura em um vetor de expressão (D8223, que é um derivado do pUC19) para criar o plasmídeo D9073. Especificamente, os 353 aminoácidos da SEQ ID NO: 5 que seguem o resíduo de metionina no terminal N da sequência correspondem a uma porção de SEQ ID NO: 3 e são codificados pela porção clonada da SEQ ID NO: 1.

[00169] A sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 5 foi então clivada do plasmídeo D9073 através da restrição da digestão de exonuclease (NdeI e BamHI) e purificada. Esta sequência purificada foi então ligada ao vetor de expressão linearizado, pET28a, e o construto circular resultante (pTDX233: DIV6901) foi transformado nas células *E. coli*. (A sequência completa do inserto foi confirmada através da análise da sequência de DNA). A expressão da proteína de fusão marcada com His foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG nas culturas de *E. coli* transformadas. A proteína recombinante foi solubilizada em ureia a 6M e purificada por afinidade de níquel e cromatografia de troca iônica. (Esta proteína recombinante é, daqui em diante, referida como "rDIV6901".) pAB anti-DIV6728 foi purificado a partir do plasma dos coelhos imunizados através do isolamento do anticorpo da IgG pela cromatografia de afinidade da proteína G.

[00170] Preparação e isolamento do anticorpo de ancilostomídeo policlonal. O anticorpo policlonal anti-ASP5-1 (IgG) foi produzido em coelho contra um polipeptídeo possuindo a sequência de aminoácido correspondente à SEQ ID NO:34 e purificado a partir de soro, através da utilização de métodos-padrão. Resumidamente, os nucleotídeos 50

a 427 da SEQ ID NO: 32 foram clonados na estrutura em um plasmídeo. Especificamente, os 129 aminoácidos da SEQ ID NO: 34 que seguem o resíduo de metionina no terminal N da sequência correspondem a uma porção da SEQ ID NO: 3 e são codificados pela porção clonada da SEQ ID NO: 32. No plasmídeo, o resíduo de metionina do terminal N foi codificado pela sequência do vetor na junção deste plasmídeo, onde o vetor foi ligado à sequência clonada da SEQ ID NO: 32.

[00171] A sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 32 foi então clivada do plasmídeo através da restrição da digestão de exonuclease (NotI e SacI) e purificada. Esta sequência purificada foi então ligada ao vetor de expressão linearizado, pET28a, e o construto circular resultante foi transformado nas células *E. coli* BL21 (DE3). (A sequência completa do inserto foi confirmada através da análise da sequência de DNA). A expressão da proteína de fusão marcada com His foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG nas culturas de *E. coli* transformadas. A proteína recombinante foi solubilizada em ureia a 6M e purificada por afinidade de níquel e cromatografia de troca iônica. (Esta proteína recombinante é, daqui em diante, referida como "rASP5-1".)

[00172] Após rASP5-1 ter sido introduzida nos coelhos, o pAB anti-ASP5-1 foi purificado a partir do plasma dos coelhos imunizados através do isolamento do anticorpo da IgG pela cromatografia de afinidade da proteína G.

[00173] Infecção de animais caninos e felinos. A infecção por nematoides parasitas foi realizada por via oral administrando cerca de 150 a 300 ovos de larvas de ascarídeo (*Toxocara canis*), 150 de 300 larvas infectadas por ancilostomídeo (*Ancylostoma canium*) ou 700 ovos de larvas de tricurídeo (*Trichuris vulpis*), ou qualquer combinação dos três em um canino ou um felino saudável. A infecção foi

confirmada através da observação microscópica de ovos de vermes nas amostras das fezes obtidas destes animais hospedeiros.

[00174] Preparação da amostra de fezes canina e felina. Os animais caninos e felinos conhecidos por estarem livres de infecções parasitárias, ou de serem infectados com um, dois ou os todos três de ascarídeo, de ancilostomídeo e de tricurídeo, fornecidos da fonte das amostras de fezes. As amostras (aproximadamente 1 grama) das amostras de fezes canina ou felina não preservadas e congeladas foram suspensas em 4 ml de solução diluente ("solução diluente" é 0,05 M de base Tris; 1 mM de EDTA; 0,45% de Kathon; 16 mg/l de sulfato de gentamicina; 0,05% de Tween-20; 40% de soro bovino fetal; 10% de soro de Coelho; e 5% de soro de camundongo). A suspensão foi centrifugado em centrífuga de mesa a 4000 rpm por 20 minutos para produzir um primeiro sobrenadante. O primeiro sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 5 minutos para produzir um segundo sobrenadante, que é referido aqui como "extrato de fezes".

[00175] Ensaios ELISA. PAB anti-DIV6728 purificado, pAB anti-DIV6901 e pAB anti-Asp5-1 (100 ul/cavidade; 3 mg/ml para o exemplo 2) foram imobilizados através da adsorção física nas placas de Immulon 1B de 96 poços durante a noite a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 1% de BSA em 0,1 M de Tris, pH 7,0 ou por 3 horas em temperatura ambiente, seguido por 2,5% de Sacarose em 0,1M do tampão Tris, pH 7,0 por 3 horas em temperatura ambiente, aspirando o líquido e seco em temperatura ambiente . Aproximadamente 100 ul de extrato de fezes foram adicionados à cada cavidade e incubados em temperatura ambiente por uma hora. As cavidades foram então lavadas cinco vezes com uma solução PBS-Tween-20, de acordo com os métodos-padrão conhecidos pelos versados na técnica. Um recipiente de reação separado, livre do pAB anti-DIV6728, pAB anti-DIV6901 e pAB anti-Asp5-1 foi marcado com a peroxidase de rábano-

silvestre (HRP), utilizando o reticulador 4-[N maleimidometil]cicloexano-1-carboxilat de succinimidila (SMCC) para criar um conjugado, e este conjugado (3 ug/ml para o Exemplo 2) foi adicionado à cada cavidade possuindo pAB anti-DIV6728 imobilizado, pAB anti-DIV6901 e pAB anti-Asp5-1. Após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, o conjugado não-ligado foi lavado das cavidades, com a solução de PBS-Tween-20 de acordo com os métodos-padrão conhecidos pelos versados na técnica. 50 ul de substrato de peroxidase TMBLUE® (SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA) foram então adicionados à cada cavidade e as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de parar cada reação enzimática com o sulfato dodecil de sódio (SDS) a 0,1%, após o período de incubação de 10 minutos, o valor de densidade óptica (DO) de cada cavidade da placa de 96 poços foi medido no padrão A650 através de técnicas espectrofotométricas padrão, utilizando um leitor de placas ELISA para gerar um "valor DO650" (ou, mais simplesmente, um "valor DO") para cada cavidade. Neste arranjo, o valor de DO obtido para qualquer cavidade da placa de 96 poços foi diretamente proporcional à quantidade de antígeno específico ligado na cavidade (se a IgG não estiver saturada).

EXEMPLO 1

[00176] Quando testados por ELISA em um formato de fluxo lateral, o pAB anti-DIV6728 liga especificamente o coproantígeno de ascarídeo, o pAB anti-DIV6901 liga especificamente o coproantígeno de tricurídeo e o pAB anti-Asp5-1 liga especificamente o coproantígeno de ancilostomídeo. Não houve nenhuma ligação cruzada de coproantígeno entre os anticorpos de helmintos e seus helmintos não específicos. A ligação específica do coproantígeno de ascarídeo pelo pAB anti-DIV6728, de coproantígeno de tricurídeo pelo

pAB anti-DIV6901 e de coproantígeno de ancilostomídeo pelo anti-Asp5-1 produz uma mudança colorimétrica, que é facilmente visível a olho humano.

[00177] Um objetivo do exemplo 1 foi determinar se o pAB anti-DIV6728, pAB anti-DIV6901 e pAB anti-Asp5-1 podem ser usados para capturar e ligar especificamente seus respectivos coproantígenos de helmintos sem uma ligação não-específica em um fluxo lateral por ELISA. O formato de fluxo lateral utilizado foi um dispositivo de ensaio SNAP®, semelhante ao que está descrito na Patente U.S. Nº 5.726.010. Além disso, o ensaio foi realizado, geralmente, conforme descrito nesta mesma Patente. Resumidamente, entre outros componentes, o dispositivo de ensaio SNAP® incluiu um copo da amostra de entrada, um fluxo de matriz, uma amostra da almofada pré-filtro para remover partículas de interferência, uma almofada de reagentes específicos de ligação, uma zona reativa e um reservatório absorvente. pAB anti-DIV6728, pAB anti-DIV6901 e pAB anti-Asp5-1 foram imobilizados sob a forma de manchas pequenas manchas e arredondadas na zona reativa por secagem. A zona reativa foi então bloqueada com BSA. Um conjunto do extrato de fezes (150 uL) dos caninos infectados por ascarídeo foi misturado com 200 ul (1,0 ug/ml) do conjugado do pAB anti-DIV6728, pAB anti-DIV6901 ou pAB anti-Asp5-1 (os anticorpos foram purificados por afinidade antes de serem marcados com HRP, tal como descrito acima). Esta mistura foi adicionada ao copo de amostra e em seguida foi permitida fluir ao longo matriz de fluxo. Enquanto na matriz de fluxo, os anticorpos de HRP marcados foram ligados, especificamente, aos seus respectivos coproantígenos de helmintos presentes no extrato das fezes. Os complexos resultantes (ou seja, aqueles que incluíram os anticorpos de HRP marcados e os seus respectivos coproantígenos de helmintos) foram permitidos a se ligarem, especificamente, ao pAB anti-DIV6728,

pAB anti-DIV6901 ou pAB anti-Asp5-1 imobilizados na zona de reação. O fluxo ao longo da matriz de fluxo foi revertido pelo contato do reservatório absorvente com a matriz de fluxo. Neste momento, o detector e a solução de lavagem migraram para a matriz de fluxo para remover quaisquer componentes não ligados e para permitir a detecção de quaisquer complexos de analito que estavam presentes onde o reagente de captura foi imobilizada na zona de reação. (Esta etapa de detecção durou cerca de oito minutos.) A interrupção da detecção dos complexos de analito ocorreu através da exposição dos complexos de analito a azida de sódio a 0,1%.

[00178] Como mostrado nas figuras 1C a E, a detecção de complexos de analitos específicos de helmintos, onde os anticorpos específicos de ascarídeo, de tricurídeo e de ancilostomídeo foram imobilizados em zonas de reação separadas, foi visivelmente aparente de uma infecção por ascarídeo (1D), uma infecção por tricurídeo (1E) e uma infecção por ancilostomídeo (1C) . Na amostra de controle negativo, mostrada na figura 1A (apenas solução diluente), não foram detectados complexos de analito. Em uma amostra de controle negativo mostrada na figura 1B, não foram detectados complexos de analitos onde o anticorpo foi imobilizado na zona de reação de um dispositivo separado (a amostra de controle negativo foi um conjunto de extratos de fezes de caninos que não apresentam uma infecção por helminto). Estes dados indicam, portanto, que o pAB anti-DIV6728, o pAB anti-DIV6901 e o pAB anti-Asp5-1 podem ser usados em um formato de fluxo lateral de ELISA para separada e especificamente se ligarem aos seus coproantígenos de helminto respectivos. Esta ligação específica é facilmente visível a olho humano.

EXEMPLO 2

[00179] Quando testados por ELISA em um formato de prato de microtitulação, o pAB anti-DIV6728 liga especificamente o

coproantígeno de ascarídeo, mas não liga, especificamente, o coproantígenos de ancilostomídeo, tricurídeo ou verme do coração; o pAB anti-DIV6901 liga especificamente o coproantígeno de tricurídeo, mas não liga, especificamente, o coproantígeno de ancilostomídeo, ascarídeo ou a dirofilariose; e o pAB anti-Asp5-1 liga, especificamente, o coproantígeno de ancilostomídeo, mas não liga, especificamente, o coproantígeno de ascarídeo, de tricurídeo ou de dirofilariose. A ligação específica de coproantígeno de ascarídeo pelo pAB anti-DIV6728, do coproantígeno de tricurídeo pelo pAB anti-DIV6901 e do coproantígeno de ancilostomídeo pelo pAB anti-Asp5-1 produz uma mudança colorimétrica, que é facilmente visível a olho humano.

[00180] Um objetivo do Exemplo 2 foi determinar se a ligação específica entre o pAB anti-DIV6728 e o coproantígeno de ascarídeo; o pAB anti-DIV6901 e o coproantígeno de tricurídeo; e o pAB anti-Asp5-1 e o coproantígeno de ancilostomídeo, enquanto o pAB anti-DIV6728, o AB anti-DIV6901 e o pAB anti-Asp5-1 são imobilizados em um suporte sólido, pode produzir uma mudança colorimétrica, que é facilmente visível a olho humano.

[00181] Referindo-se à figura 2, o pAB anti-DIV6728 (3 ug/ml) foi imobilizado ns superfícies do fundo das cavidades D1-D12 e E1-E12, o pAB anti-DIV6901 PAB foi imobilizada na superfície do fundo das cavidades G1-G12 e H1-H12 e o pAB anti-Asp5-1 foi imobilizado na superfície do fundo das cavidades A1-A12 e B1-B12 de uma placa de microtitulação, como descrito anteriormente. Após tal imobilização, as cavidades A3, B3, D3, E3, G3 e H3 foram expostas ao extrato de fezes de canino infectado por dirofilariose (indicado por "HW" na figura 2). As cavidades A4, B4, D4, E4, G4 e H4 foram expostas ao extrato de fezes de um primeiro canino infectado por ancilostomídeo, as cavidades A5, B5, D5, E5, G5 e H5 foram expostas ao extrato de fezes de um segundo canino infectado por ancilostomídeo, e as cavidades A6, B6,

D6, E6, G6 e H6 foram expostas ao extrato de fezes de um terceiro canino infectado por ancilostomídeo. As cavidades A7, B7, D7, E7, G7 e H7 foram expostas ao extrato de fezes de um primeiro canino infectado por ascarídeo, as cavidades A8, B8, D8, E8, G8 e H8 foram expostas ao extrato de fezes de um segundo canino infectado por ascarídeo, e as cavidades A9, B9, D9, E9, G9 e H9 foram expostas ao extrato de fezes de um terceiro canino infectado por ascarídeo. As cavidades A10, B10, D10, E10, G10 e H10 foram expostas ao extrato de fezes de um primeiro canino infectado por tricurídeo, as cavidades A11, B11, D11, E11, G11 e H11 foram expostas ao extrato de fezes de um segundo canino infectado por tricurídeo, e as cavidades A12, B12, D12, E12, G12 e H12 foram expostas ao extrato de fezes de um terceiro canino infectado por tricurídeo. As cavidades A1, B1, D1, E1, G1 e H1 foram expostas a rDIV6728, rDIV6901 e rAsp5-1 (1 ug/ml), e, portanto, as cavidades serviram como controles positivos. As cavidades A2, B2, D2, E2, G2 e H2 não foram expostas a qualquer extrato de fezes ou a rDIV6728, rDIV6901 e rAsp5-1 e, portanto, as cavidades serviram como controles negativos. Após a lavagem, as cavidades D1-12 e E1-12 foram expostas ao pAB rDIV6728 de HRP marcado; as cavidades G1-G12 e H12-H1 foram expostas ao pAB rDIV6901 de HRP marcados; as cavidades A1, A12 e B12-B1 foram expostas ao PAB rASP5-1 de HRP marcado a 3 ug/ml, conforme descrito acima.

[00182] Após a incubação de todas estas cavidades com o substrato de peroxidase TMBLUE® e a adição subsequente da SDS, a mudança colorimétrica foi observada visualmente nas cavidades do pAB anti-DIV6728 que foram expostas ao extrato de fezes de caninos infectados por ascarídeo (D7 a D9 e E7 a E9), mas nenhuma mudança colorimétrica foi observado em qualquer uma das cavidades do pAB anti-DIV6728 PAB que foram expostas ao extrato de fezes de caninos

infectados tanto por ancilostomídeo, tricurídeo quanto dirofilariose. A mudança colorimétrica foi observada visualmente nas cavidades do pAB anti-DIV6901 que foram expostas ao extrato de fezes de caninos infectados por tricurídeo (G10 a G12 e H10 a H12), mas nenhuma mudança colorimétrica foi observado em qualquer uma das cavidades do pAB anti-DIV6901 que foram expostas ao extrato de fezes de caninos infectados tanto por ancilostomídeo, tricurídeo quanto dirofilariose. A mudança colorimétrica foi visualmente observada nas cavidades do pAB anti-Asp5-1 que foram expostas ao extrato de fezes de caninos infectados por ancilostomídeo (A4 a A6 e B4 a B6), mas nenhuma mudança colorimétrica foi observada em qualquer uma das cavidades do pAB anti-Asp5-1 que foram expostas ao extrato de fezes de caninos infectados tanto por ascarídeo, tricurídeo quanto dirofilariose.

[00183] Estes dados indicam que o pAB anti-DIV6728 detecta ascarídeo; o pAB anti-DIV6901 detecta tricurídeo; e o pAB anti-Asp5-1 detecta ancilostomídeo em um formato de ELISA suficientemente o bastante para produzir uma mudança colorimétrica, que é robusta e facilmente visível a olho humano. Além disso, estes dados indicam que tal mudança colorimétrica permite, facilmente a olho humano, distinguir entre as amostras de fezes de helm into específicas contendo ascarídeo, ancilostomídeo e tricurídeo.

EXEMPLO 3

[00184] Uma versão truncada do DIV6728 e Copro6728, está presente nas fezes dos caninos infectados por *T. canis*.

A. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE FEZES CANINAS

[00185] Os animais caninos conhecidos por apresentar uma infecção por ascarídeo (*T. canis*) ou por não possuir uma infecção pelo verme parasita forneceram a fonte das amostras de fezes. Uma amostra (aproximadamente de 1 grama) do conjunto das fezes

caninas não conservadas e congeladas de cinco caninos infectados ou não infectados por ascarídeo foi suspensa em 4 ml do tampão de extração (o "tampão de extração" é solução salina de fosfato tamponada a 1X (PBS), pH 7,0 a 7,5, com 0,05% de Tween-20). Esta suspensão foi centrifugada por 2 minutos e depois foi centrifugado a 13.000 rpm por 25 minutos para produzir um primeiro sobrenadante. O primeiro sobrenadante foi então centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos para produzir um segundo sobrenadante. Este segundo sobrenadante daqui por diante será referido como "extrato de fezes".

B. TROCA IÔNICA

[00186] A cromatografia de troca iônica pode enriquecer a Copro6728 de uma amostra de fezes. As amostras PLRS foram utilizadas para este estudo. A amostra de fezes foi extraída primeiro com PBST (0,05% de Tween 20) e pH 7,3. A amostra foi primeiro diluída com tampão de citrato de sódio, pH 3,0 e, em seguida, o pH foi ajustado para 3 com HCl. Finalmente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi carregado na uma coluna de sulfopropila (SP). A coluna de SP foi eluída com o tampão de citrato de sódio a 20 mM, pH 3 com NaCl a 1M, e as frações de eluição foram avaliadas por ELISA. A placa de ELISA foi revestida com um IgG de coelho anti-6728 a 3 ug/ml. Com base nos resultados mostrados na figura 15, fica claro que Copro6728 pode ser parcialmente purificada e enriquecida por eluição da coluna de SP com o tampão de citrato de sódio com NaCl a 1M e Copro6728 está na fração entre A11 e C9 (figura 15).

C. WESTERN BLOTTING E SDS-PAGE

[00187] Western blotting e o gel SDS-PAGE mostraram que o peso molecular de Copro6728 é de cerca de 7 kD. As frações de eluição da coluna de SP foram misturadas e o tampão pH foi ajustado para 7 com NaOH antes de carregar em uma coluna de afinidade, que foi preparada ligando a IgG de coelho anti-6728 com a resina AminoLink

(Pierce, Thermo Scientific). A coluna foi lavada e eluída de acordo com instruções do fabricante. As frações de eluição foram carregadas em uma cavidade 10 de 4 a 12% do gel gradiente Bis-Tris e transferidas para a membrana de nitrocelulose para Western Blotting. Sondado com a IgG de coelho anti-6728HRP, o western blotting mostrou que a faixa principal (Copro6728) é de cerca de 7 kD (seta vermelha na figura 16). Depois de uma maior concentração, as mesmas amostras foram visualizadas em gel SDS-PAGE com a Colaração da Proteína Imperial (Pierce, Thermo Scientific). A faixa de 7 kD correspondente ao tamanho indicado pela IgG anti-6728HRP está visível (seta vermelha na figura 17).

D. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

[00188] A análise da espectrometria de massa na faixa cortada do gel SDS-PAGE (apontada pela seta vermelha na figura 17) indicou que esta faixa contém Copro6728, e que a porção no terminal C de DIV6728 contém Copro6728.

[00189] A faixa de 7 kD que corresponde à faixa de 7 kD no Western blotting foi cortada do gel SDS-PAGE e enviada para o Centro de Keck da Universidade de Yale para a análise da espectrometria de massa. A amostra no gel foi primeiro digerida de tripsina e depois analisada por LC-MS/MS, utilizando o Q-Tof do espectrômetro de massa Ultima (Waters). Dois peptídeos específicos foram encontrados na amostra através da análise de espectrometria de massa: Peptídeo 1: R.FVPCTR.N (SEQ ID: 35) e Peptídeo 2: R.DAEGNCIK.F (SEQ ID NO: 36).

[00190] A análise do alinhamento nas sequências de DIV6728 (SEQ ID NO: 21) e os dois peptídeos identificados através da análise MS, indicaram que ambos os peptídeos estão localizados na extremidade do terminal C do comprimento total de DIV6728, confirmando que a faixa de 7 kD identificada pelo Western blot é

derivada de DIV6728. A localização das duas sequências de peptídeo indica que uma porção do terminal C de DIV6728 (Copro6728) esteve presente nas amostras de fezes positivas *T. canis*. A figura 18 mostra o comprimento total de DIV6728 (SEQ ID NO: 21), com os dois peptídeos identificados pela análise de MS em destaque nas caixas sombreadas.

EXEMPLO 4

[00191] Duas proteínas recombinantes foram geradas correspondendo aos 64 aminoácidos na porção terminal N de DIV6728 e aos 65 aminoácidos na porção terminal C de DIV6728.

[00192] Com base na análise de MS foram encontrados dados de western blotting e SDS-PAGE e dois novos truncamentos codificados de construtos de expressão de DIV6728. Eles foram nomeados 6728N (SEQ ID NO: 37) e 6728C (SEQ ID NO: 38) para o terminal N e para o terminal C do comprimento total de DIV6728, respectivamente. A figura 19 mostra um alinhamento das sequências de aminoácidos de 6728N (SEQ ID NO: 37) e de 6728C (SEQ ID NO: 38) codificadas pelos construtos.

A. GENES SINTÉTICOS PARA EXPRESSAR 6728N E 6728C RECOMBINANTE

[00193] Os genes para expressar os polipeptídeos 6728N e 6728C foram códon otimizado para a expressão em *E. coli*, sintetizados e clonados em vetor pET28(a) com seis etiquetas de His(6) no terminal N de cada proteína recombinante pelo GeneArt (Josef-Engert-Str. 11D-93053 Regensburg, Alemanha).

B. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 6728N E 6728C RECOMBINANTE

[00194] As proteínas recombinantes 6728N e 6728C foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas em uma coluna de níquel simples. O plasmídeo pET28 (a) 6728N foi transformado em BL21 (DE3), crescido em um OD ~ 0,8 e induzido com IPTG a 1mM

(isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo) a 37°C por 2 horas. As células foram lisadas com o Processador Microfluidizer®, M-11EH. A 6728N recombinante foi dissolvido no tampão Tris a 20 mM, pH 8,0, com NaCl a 500 mM e foi purificado através da etapa de eluição da coluna de níquel com as diferentes concentrações de imidazol em um tampão Tris a 20 mM, pH 8,0, com NaCl a 500 mM. A 6728N recombinante foi eluída da coluna de níquel através do mesmo tampão com imidazol a 500 mM. A figura 20 é um gel SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação da 6728N recombinante. A 6728N recombinante é de cerca de ~ 12 kD em tamanho (faixa 9) no gel.

[00195] O plasmídeo pET28(a) da 6728C foi transformado em BL21 (DE3), crescido em um OD~0,8 e induzido com IPTG a 1nM (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo) a 37 °C por 2 horas. As células foram lisadas com o Processador Microfluidizer®, M-11EH. A 6728C recombinante foi dissolvida em um tampão Tris a 20 mM, pH 8,0, com NaCl a 500 mM e foi purificada através da etapa de eluição da coluna de níquel com diferentes concentrações de imidazol em um tampão Tris a 20 mM, pH 8,0, com NaCl a 500 mM. A 6728C recombinante foi eluída da coluna de níquel pelo mesmo tampão com imidazol a 500 mM. A figura 21 é um gel SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para confirmar a purificação da 6728C recombinante. A 6728C recombinante é de cerca de ~12 kD em tamanho (faixa 9) no gel.

C. ANTICORPOS DE COELHO POLICLONAIS

[00196] O anticorpo de Coelho policlonal produzido contra 6728C detecta antígeno nas fezes de ELISA, enquanto o anticorpo policlonal contra 6728N não detecta o antígeno nas fezes de ELISA.

[00197] As proteínas recombinantes 6728N e 6728C, purificadas com uma coluna de níquel simples, foram utilizadas para imunizar os coelhos para a produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos

policlonais a partir do soro do coelho imunizado foram purificados por afinidade com a resina da proteína G e foram usados para revestir as placas Immulon I a 2 ug/ml. Quatro amostras diferentes de caninos foram testadas com diferentes placas revestidas de anticorpos. Os anticorpos dos dois coelhos imunizados com 6728C recombinante poderiam diferenciar as amostras de fezes positivas de *T. canis* de amostras positivas de ancilostomídeos e tricurídeos e amostras negativas de nematoides. No entanto, os anticorpos dos dois coelhos imunizados com 6728N recombinante não conseguiu diferenciar as amostras de fezes positivas de *T. canis* das amostras positivas de ancilostomídeo e tricurídeos e amostras negativas de nematoides (figura 22). Estes dados ELISA ainda demonstram que Copro6728 é uma porção do terminal C do comprimento total de DIV6728. Outras experiências mostraram que os anticorpos produzidos contra a 6728C e 6728N apenas reconhecem suas proteínas recombinantes cognatas sem reação cruzada. (figura 23). Ambos destes anticorpos policlonais reagem com o comprimento total recombinante de DIV6728 recombinante como esperado (figura 23).

D. WESTERN BLOTTING

[00198] O anticorpo de coelho policlonal contra a 6728C recombinante pode reconhecer as amostras de fezes positivas *T. canis* em Western Blotting, mas não o anticorpo policlonal contra a 6728N recombinante. Além do extrato de verme total *T. canis* (faixa 1), o nematoide negativo (faixas 2 a 4) e *T. canis* positivo (faixas 5 a 7), as amostras de fezes foram fracionadas pela coluna de SPVcom o tampão de eluição elevada de sal (NaCl a 1M em um tampão de citrato de sódio a 20 mM, pH 3). O extrato de verme *T. canis* (faixa 1), as amostras carregadas na coluna (faixas 2 e 5), a coluna de fluxo através (faixas 3 e 6), e a coluna de eluição (faixa 4 e 7) foram carregados em um gel gradiente Bis-Tris de 4 a 12%, com 10

cavidades e em seguida transferidos para a membrana de nitrocelulose, sondado com diferentes conjugados, conforme indicado nas figuras 24 a 26. Tanto o comprimento total de IgG HRP anti-6728 quanto o IgG-HRP anti-6728C podem diferenciar a amostra de fezes positiva *T. canis* das amostras de fezes negativas do nematoide (figuras 24 e 25). No entanto, IgG-HRP anti-6728N não poderia diferenciar esses dois tipos de amostras de fezes (figura 26). Estes dados confirmaram ainda que Copro6728 é apenas cerca da metade do tamanho do comprimento total de DIV6728, de acordo com os dados obtidos na análise de espectrometria de massa e das fezes por ELISA.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar a presença ou a ausência de um ou mais coproantígenos de verme helminto em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contatar uma amostra de um mamífero com pelo menos dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em:

(i) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de ascarídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a 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: 38, ou Copro6728; ou o primeiro anticorpo foi produzido contra um extrato de ascarídeos completo, ou um extrato de órgãos reprodutivos de ascarídeo ou um extrato de intestino de ascarídeo;

(ii) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de tricurídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 9; e

(iii) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de ancilostomídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:33 ou SEQ ID NO: 34, ou CoproASP5;

(b) formar os complexos coproantígeno-anticorpos na presença dos coproantígenos, se houver, na amostra; e

(c) detectar a presença ou a ausência dos complexos coproantígeno-anticorpo, se houver.

2. Método para diagnosticar se um mamífero está infectado por um ou mais vermes helmintos parasitas, caracterizado pelo fato de

que compreende as etapas de:

(a) contatar uma amostra de um mamífero com pelo menos dois anticorpos selecionados do grupo consisitindo em:

(i) um primeiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de ascarídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a 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: 38, ou Copro6728; ou o primeiro anticorpo foi produzido contra um extrato de ascarídeos completo, ou um extrato de órgãos reprodutivos de ascarídeo ou um extrato de intestino de ascarídeo;

(ii) um segundo anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de tricurídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 9; e

(iii) um terceiro anticorpo capaz de ligar, especificamente, a um coproantígeno de ancilostomídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:33 ou SEQ ID NO: 34, ou CoproASP5;

(b) formar os complexos coproantígeno-anticorpos na presença dos coproantígenos de vermes helmintos, se houver, na amostra; e

(c) detectar a presença ou a ausência dos complexos coproantígeno- anticorpo, se houver; e

(d) diagnosticar o mamífero como possuindo:

(i) uma infecção por ascarídeo se o complexo coproantígeno-anticorpo estiver presente;

(ii) uma infecção por tricurídeo se o complexo coproantígeno-

anticorpo estiver presente; e

(iii) uma infecção por ancilostomídeo se o complexo coproantígeno-anticorpo estiver presente.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde à 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: 38 ou Copro6728; ou o primeiro anticorpo foi produzido contra um extrato de ascarídeos completo, ou um extrato de órgãos reprodutivos de ascarídeo ou um extrato de intestino de ascarídeo.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o segundo anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que terceiro anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde à SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34 ou CoproASP5.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a amostra é obtida de um mamífero que é um canino ou felino.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o verme helminto é um ascarídeo selecionado de *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, *Toxocara vitulorum*, *Toxascaris leonina*, *Baylisascaris procyonis*, *Ascaridia galli*, *Parascaris*

equorum, *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Anisakis simplex*, ou *Pseudoterranova decipiens*.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o verme helminto é um tricurídeo selecionado de *Trichuris vulpis*, *Trichuris campanula*, *Trichuris serrata*, *Trichuris suis*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris discolor* e *Trichocephalus trichiuris*.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o verme helminto é um ancilostomídeo selecionado de *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Ancylostoma pluridentatum*, *Necator americanus*, e *Uncinaria stenocephala*.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o coproantígeno de ascarídeo, o coproantígeno de ancilostomídeo e/ou coproantígeno de tricurídeo são de uma amostra de fezes.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que os primeiro, segundo e terceiro anticorpos não ligam, especificamente, quaisquer coproantígenos derivados de dirofilariose.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a etapa de detectar a presença ou a ausência dos complexos inclui ainda a etapa de fornecer pelo menos um anticorpo secundário que se liga a pelo menos um dos complexos.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que pelo menos um anticorpo secundário é marcado.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos primeiro, segundo

e terceiro anticorpos são marcados.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que os primeiro, segundo e terceiro anticorpos são imobilizados em um suporte sólido.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido forma parte de um dispositivo de ensaio de imunoabsorção enzimática.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de ensaio de imunoabsorção enzimática é um dispositivo de imunoensaio de fluxo lateral.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de contatar a amostra com um ou mais reagentes para detectar um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais parasitas que não são vermes, dirofilariose, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que os reagentes para detectar qualquer um ou todos de um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias são um ou mais anticorpos, ou um ou mais antígenos reconhecidos pelos anticorpos específicos para um ou mais parasitas que não são vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de determinar a presença ou a ausência de um ácido nucleico de ascarídeo, de tricurídeo ou de ancilostomídeo.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico possui uma sequência que corresponde à 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, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38, Copro6728 ou CoproASP5.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a etapa de determinar a presença ou a ausência do ácido nucleico é realizada através da utilização de um ensaio com base na reação em cadeia da polimerase (PCR).

23. Dispositivo para detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de helmintos de uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende um suporte sólido, em que o suporte sólido possui imobilizado nele, pelo menos, dois anticorpos selecionados do grupo consistindo em:

(a) um primeiro anticorpo capaz de ligar especificamente a um coproantígeno de ascarídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a 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: 38, ou Copro6728; ou o primeiro anticorpo foi produzido contra um extrato de ascarídeos completo, ou um extrato de órgãos reprodutivos de ascarídeo ou um extrato de intestino de ascarídeo;

(b) um segundo anticorpo capaz de ligar especificamente a um coproantígeno de tricurídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 9; e

(c) um terceiro anticorpo capaz de ligar especificamente a um coproantígeno de ancilostomídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO:33 ou SEQ ID NO: 34, ou CoproASP5.

24. Dispositivo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ou mais tipos de antígeno de ascarídeo, de antígeno de tricurídeo e/ou de antígeno de ancilostomídeo, em que um ou mais tipos de antígeno de ascarídeo, de antígeno de tricurídeo e de antígeno de ancilostomídeo estão ligados especificamente aos anticorpos.

25. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que o primeiro anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde à 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: 38, ou Copro6728 ou a uma porção antigênica do mesmo; ou o primeiro anticorpo foi gerado contra um extrato de ascarídeos completo, ou um extrato de órgãos reprodutivos de ascarídeo ou um extrato de intestino de ascarídeo.

26. Dispositivo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o segundo anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9 ou a uma porção antigênica do mesmo.

27. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que o terceiro anticorpo é capaz de ligar, especificamente, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34, ou CoproASP5, ou a uma porção antigênica do mesmo.

28. Dispositivo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que os primeiro, segundo e terceiro

anticorpos são obtidos através da imunização com um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos que corresponde a 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, SEQ ID NO: 38, Copro6728 ou CoproASP5, ou que possui uma porção antigênica da 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 N.O: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, Copro6728 ou CoproASP5.

29. Dispositivo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra de fezes.

30. Dispositivo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que os primeiro, segundo e terceiro anticorpos não ligam, especificamente, qualquer coproantígeno derivado de dirofilariose.

31. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 30, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de ensaio de imunoabsorção enzimática.

32. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de ensaio de imunoabsorção enzimática é um dispositivo de imunoensaio de fluxo lateral.

33. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 32, caracterizado pelo fato de que a amostra é de

um canino ou de um felino.

34. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 33, caracterizado pelo fato de que o dispositivo inclui ainda um ou mais reagentes para detectar um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais parasitas que não são vermes, dirofilariose, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

35. Kit para detectar um ou mais coproantígenos de ascarídeo, um ou mais coproantígenos de tricurídeo e/ou um ou mais coproantígenos de ancilostomídeo em uma amostra de mamíferos, caracterizado pelo fato de que compreende o dispositivo como definido em qualquer uma das reivindicações 23 a 34, e um ou mais reagentes suficientes para detectar um ou mais antígenos.

36. Kit de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que um ou mais reagentes são selecionados do grupo consistindo em um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos de marcação de anticorpos, um ou mais anticorpos, um ou mais reagentes de captura de antígeno, um ou mais inibidores e um ou mais reagentes de lavagem.

FIG. 1

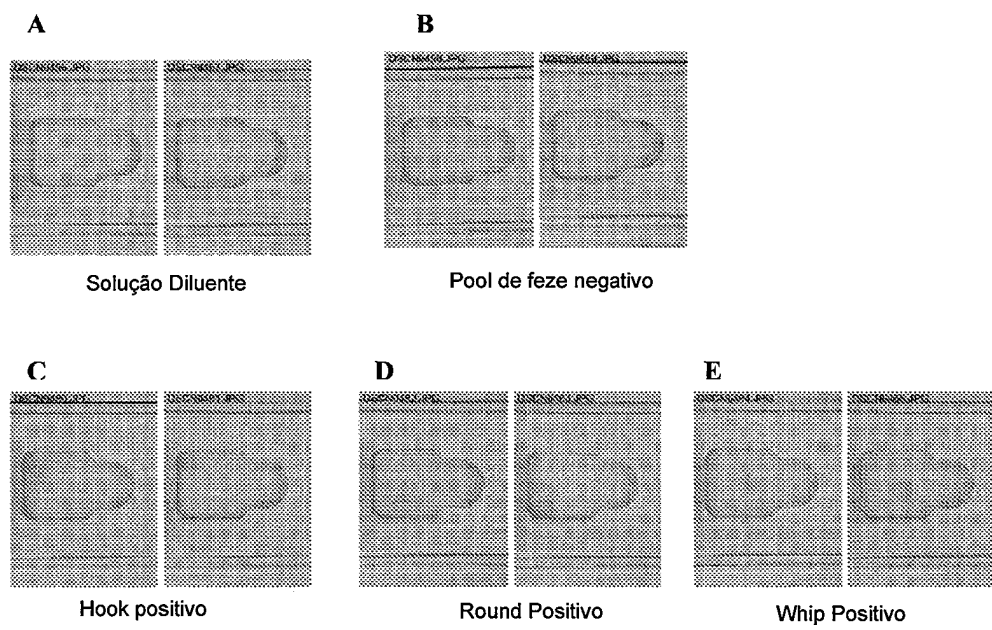
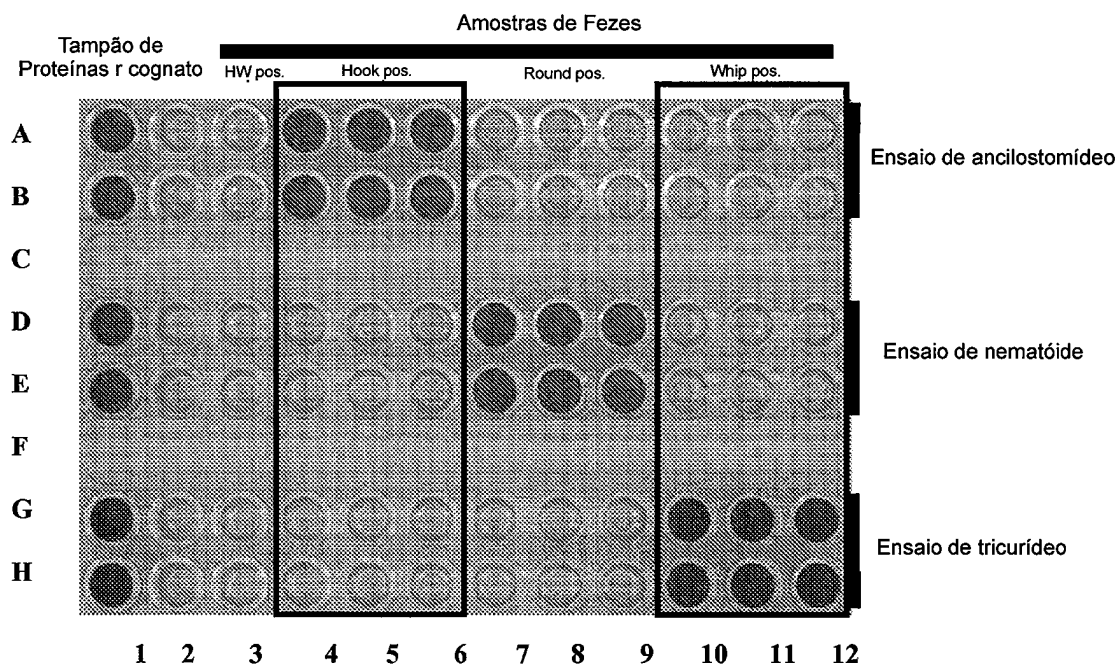


FIG. 2

Três ensaios de nematóides



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
cgaagtgggtg	aaaccgggtc	attgcccagc	tattccagcg	gttacgggca	tggcgaactt	300
ctgtaacact	gatggcgact	gtgatggacc	gaaaaaatgt	tgtctcacat	cgcgcggtta	360
cgattgcaca	catccattac	acttcccaat	ccagccacaa	cctccagtag	gacagtggcc	420
tccttcaaag	cccogtatcc	caggaaaaatg	ggtagacatc	tgcgctaagc	atgccaaactg	480
cccagaccca	gagaagtgtt	gcgacacgga	gtatggcaac	cgatgtatgg	atgttggatt	540
agtgccagga	caaggagaaa	gaccaggcaa	ttgcccgaa	gaaccacgaa	taagaggaac	600
taaatacgat	tgccgacgag	acgatgactg	cgacgggtgtg	cagaaatgct	gcttcaactgt	660
tgagggacgt	gagtgcgtgg	aaccaagtag	aaaaccactg	gacaagcccg	gacattgtcc	720
accaattccc	gctgatgtgg	gctcagccag	gtactgcgac	actgatccgg	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
caactgcccc	aaggaaaccac	gaataagagg	aactaagtac	gactgtcgac	gggacgatga	1080
ctgcgatggg	aaacaaaagt	gctgctacac	aactgaaggc	cgcgaaatgcg	tccatgggat	1140
atggccttaa	atggttgctt	cttcctataa	taaaagcaaa	cgaatcaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaaa						1210

(SEQ TO NO:1)

FIG. 3

gtaagagaaa	aacgtggcaa	atgtcctcctgaaccaccga	tgcagagaaa	cacgatctac	60
tgccgcgatg	atthttgattg	tggaggaagacagaagtgt	gtacaattgc	agaaggacgt	120
ggatgcgtgc	cgccctatgg	tgaacaagatttcgaagtgg	tgaaaccggg	tcattgcca	180
gctattccag	cggttacggg	catggcgaacttctgtaaca	ctgatggcga	ctgtgatgga	240
ccgaaaaaat	gttgtctcac	atcgcgcggtacgattgta	cacatccgtt	acacttcca	300
atccagccac	aacctccagt	aggacagtgcctctctcaa	agccccgtgt	tccaggaaaa	360
tgggtagaca	tctgcgctaa	gcatgcccaattgccagacc	cagagaagtg	ttgcgacacg	420
gagtattggca	accgatgtat	ggatgttgattagtggcag	gacaaggaga	aagaccaggc	480
aattgcccga	acgaaccacg	aataagagggaactaaatacg	attgccgacg	agacgatgac	540
tgcgacggtg	tcgagaaatg	ctgcttcaactgttgagggac	gtgagtgcgt	ggaaccaagc	600
agaaaaccac	tggacaagcc	cggacattgtccaccaattc	ccgctgatgt	gggtcagcc	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	agaaaaacctgccaaactgcc	caaaggaaacc	acgaataagg	960
ggaactaagt	acgactgtcg	acgggacgatgactgcgatg	ggaaacaaaa	gtgctgctac	1020
acaactgaag	gccgcgaatg	cgtccatggtatatggcct			1059

(SEQ ID NO:2)

FIG. 4

Consenso (SEQ ID NO: 9) XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDEDCGGROKCCCTIAEGRGCVPPYGEQXFEVVKPGHCPA
10 20 30 40 50 60 70 80
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
(SEQ ID NO: 3) MRLVETAVIYLTIGFLTDAVREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDEDCGGROKCCCTIAEGRGCVWYGEQHFVVKPGHCPA 80
(SEQ ID NO: 4) -----VREKRGKCPPEPPIAGNTIYCRDDDFCGGRKCCCTIAEGRGCVPPYGEQDFEVVKPGHCPA 61

Consenso (SEQ ID NO: 9) IPAVTGMANECSNIDGDCGMCLISRGYDCTHPLHETIOPFPVGGQPPSKPRXPGKWVDICAKHANCPCDPEKCCDTE
90 100 110 120 130 140 150 160
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
(SEQ ID NO: 3) IPAVIGMANECNIDGDCGPKKCCCLISRGYDCTHPLHETIOPFPVGGQPPSKPRXPGKWVDICAKHANCPCDPEKCCDTE 160
(SEQ ID NO: 4) IPAVIGMANECNIDGDCGPKKCCCLISRGYDCTHPLHETIOPFPVGGQPPSKPRXPGKWVDICAKHANCPCDPEKCCDTE 141

Consenso (SEQ ID NO: 9) YGNRCMDVGLVXG&GERPGNCPNEPRIRGIKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVESRKPPLDKPGHCPIPADVGSAR
170 180 190 200 210 220 230 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
(SEQ ID NO: 3) YGNRCMDVGLVPGQGERPGNCPNEPRIRGTIKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVESRKPPLDKPGHCPIPADVGSAR 240
(SEQ ID NO: 4) YGNRCMDVGLVAGQGERPGNCPNEPRIRGIKYDCRRDDDCDGVQKCCETVEGRECVESRKPPLDKPGHCPIPADVGSAR 221

Consenso (SEQ ID NO: 9) YCDTRDCDGRKCCCLSSRGYECKHPVHPDRVEPLVGECPSPRPRIPGKWVDICSKHANCPCDPEKCCDTEYGNRCMDVG
250 260 270 280 290 300 310 320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
(SEQ ID NO: 3) YCDTRDCDGRKCCCLSSRGYECKHPVHPDRVEPLVGECPSPRPRIPGKWVDICSKHANCPCDPEKCCDTEYGNRCMDVG 320
(SEQ ID NO: 4) YCDTRDCDGRKCCCLSSRGYECKHPVHPDRVEPLVGECPSPRPRIPGKWVDICSKHANCPCDPEKCCDTEYGNRCMDVG 301

Consenso (SEQ ID NO: 9) LVPQGQKEPANCPEPRIRGTIKYDCRRDDDCDGVQKCCYTTTEGRECVHGIWP
330 340 350 360 370
-----+-----+-----+-----+
(SEQ ID NO: 3) LVPQGQKEPANCPEPRIRGTIKYDCRRDDDCDGVQKCCYTTTEGRECVHGIWP 372 (SEQ ID NO: 4)
LVPQGQKEPANCPEPRIRGTIKYDCRRDDDCDGVQKCCYTTTEGRECVHGIWP 353

FIG. 5

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

FIG. 6

```
at ttat ggtgtggcagcttcgagacgaaggaggcatcacttcacgctcgaaaaagtctg      60
gacacccacctgaaatggcttagccacgagcaaaaggaggaaactgctgaaatgaagaaa      120
gatgggaaatcgaagaaggagctccaggataaggtgatgcacttctacgagcacctcgaa      180
ggc gatgcgaaacatgaagcaacagagcaactgaagggcg gatgccgcgagatccttaag      240
catgttggttggtgaggagaaagcagctgagatcaaagcac tgaaagattctggagcaagc      300
aaagatgagcttaaagccaaggtcgaagatgcactccacgcggtcaccgaagaagaaaag      360
aagcaacataatcgccgaatttggtccagcatgcaaggaaa ttttcgggggtgccggttgat      420
gttcgtcacaacgcgacccttataactaatatgacgcccgatgaagttgctgaaggacta      480
agaagttaacggtgatcgagctttttgcaaaaactggttgatgcttttaaattcttttaa      540
gcctttttcttgtgttatttcggaattgtaccacacgaac agttagttccgaataaagaa      600
ctgtaattatgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa      632
```

(SEQ ID NO: 11)

FIG. 7

8/26

FIG. 8

```

agtcagtagc cactttaatc catcagaatg ctctctgttc ttgcgcttttcgctcttatt    60
acttttgctg tggccgggcc ggaaagctgc ggtccaaacg aagtgtggactgaatgtacc    120
ggttgcgaaat tgaaatgtgg gcaagatgaa aatacgccgt gcacactaaactgtcgaccg    180
ccgtcatgtg agtgctctcc aggaagaggc atgagacgaa ccaacgatggaagggtgcatt    240
ccggctagtc agtgcccgca acacagggcc aagagagagg agcaatgcaagccaaatgag    300
cagtgggtcac cgtgccgagg atgtgaagga acatgcgcac aaagatttgtcccttgact    360
agaaactgcc gaccaccagg ctgtgaatgc gttgctggcg caggtttcgtacgtgacgct    420
gaaggaaact gcatcaagtt cgacgattgc ccgaagtaaa taataaccatacaaaattgct    480
gattccaatt aaaataataa atgagtcacg ctgttaaaaa aaaaaaaaaaaaaa    535

```

(SEQ ID NO:17)

FIG. 9

```
cagtcagcag ctacttttat ccacggaat gctctctgtt cttgcgcttttcgctcttat 60
tactttcgct gtggccgato cgaaaagtgt cgggtccaaac gaagtgtggactgaatgtac 120
cggttgcgag ttgaaatgcg ggcaggatga ggatacgccg tgcacactaaactgtcggcc 180
gccgtcatgt gagtgtcac caggaagagg catgagacga accgacgatgggaggtgcat 240
tccggctagt cagtgtccgc aacacagagc caagagagag gagcagtgaagccaaatga 300
gcagtgggtca ccgtgccgag gatgtgaagg aacatgcgca caaagatttgtcccttgac 360
tagaaactgc cgaccaccag gatgtgaatg cgttgctggc gcaggtttcgtacgtgacgc 420
tgcaggaaat tgcacaaagt tcgacgattg cccgaagtaa ataataaccatactaattgc 480
tgattacaat taaaataata aatgagtcca gctgttaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaa 536
```

(SEQ ID NO:18)

FIG. 10

11/26

11/26

atcagcaggt	ttcgcttcaa	atgcttccga	taactttttt	gctggcaatt	attgtcgggtg	60
cagcagtagc	tcaccgtaaa	tgtggtccaa	acgaagagt	gaccgaatgc	actggttgcg	120
aaattaagtg	cggtcaagga	gagcaaccat	gccctatgat	gtgtcgtccg	ccatcgtgtg	180
aatgcatggc	cggc aaagga	ttacgaagaa	cagcggacg	gaagatgcgtg	ccggaggcac	240
aatgccccaa	aagaatggta	aagcgagacg	aaaaatgtg	ggccaaacgag	aaattcctga	300
agtgcagagg	ttgtgagggt	acctgcaaag	aacgtctcgt	tcctgccct	agaatgtgca	360
aaccaccagg	ttgcgaatgc	cccgcttcag	aaggattcgt	tcgcaatgac	aaaggcgaat	420
gtatcaagtt	cgacgactgc	ccgaaataaa	ttcaataaat	caattttgt	(SEQ ID NO: 24)	469

FIG. 12

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

FIG. 13

14/26

14/26

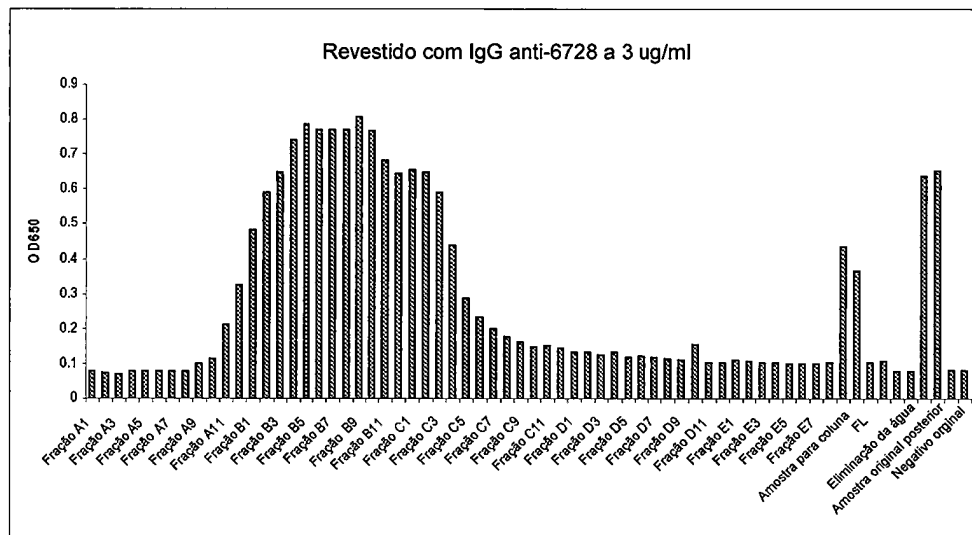
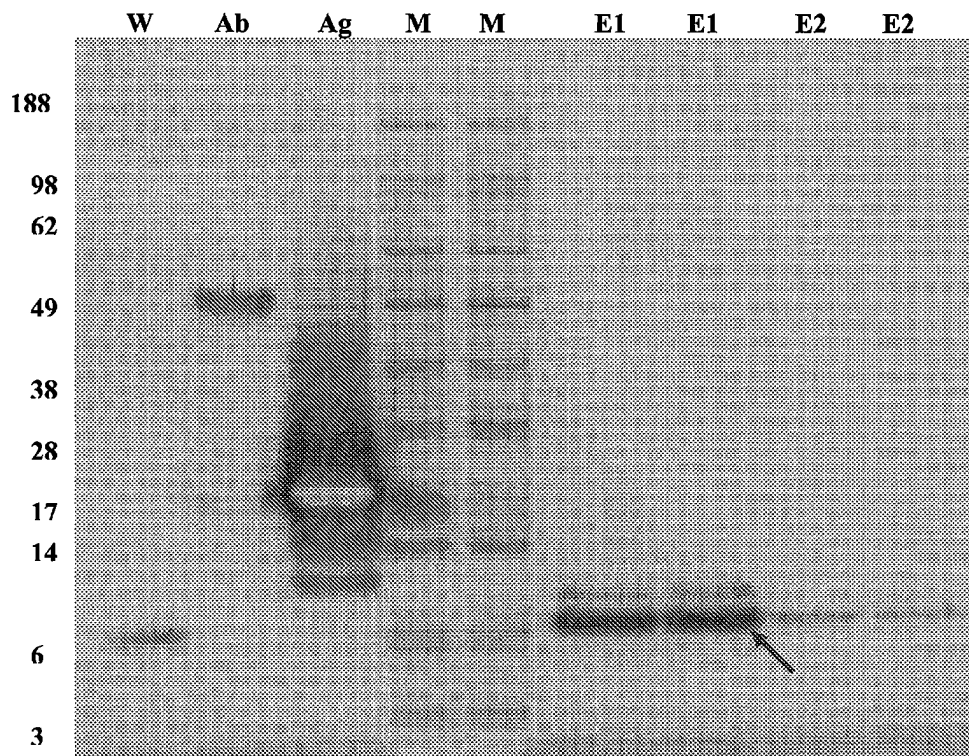
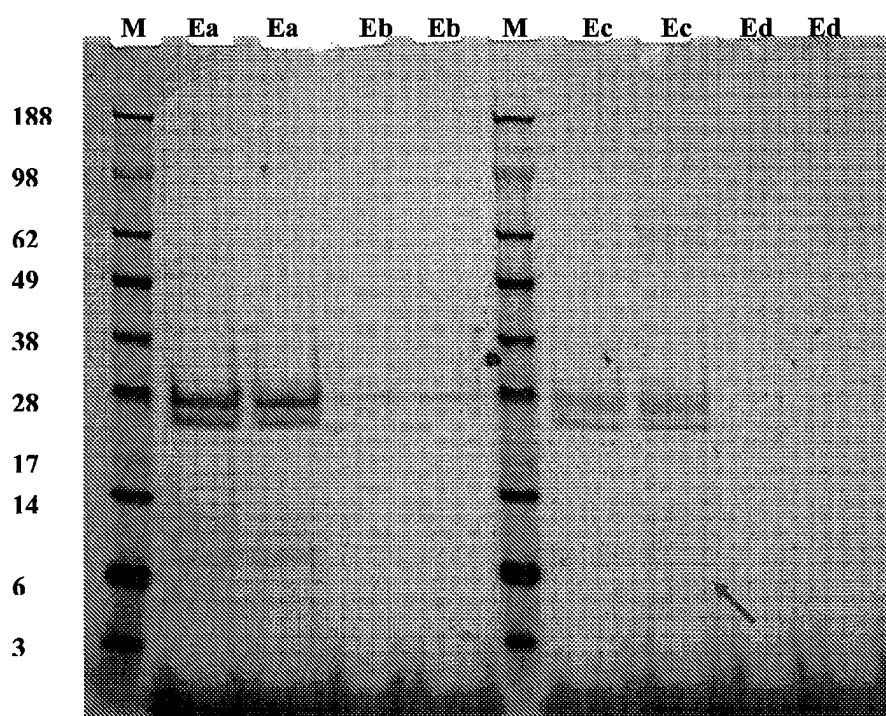


FIG. 15

**FIG. 16**

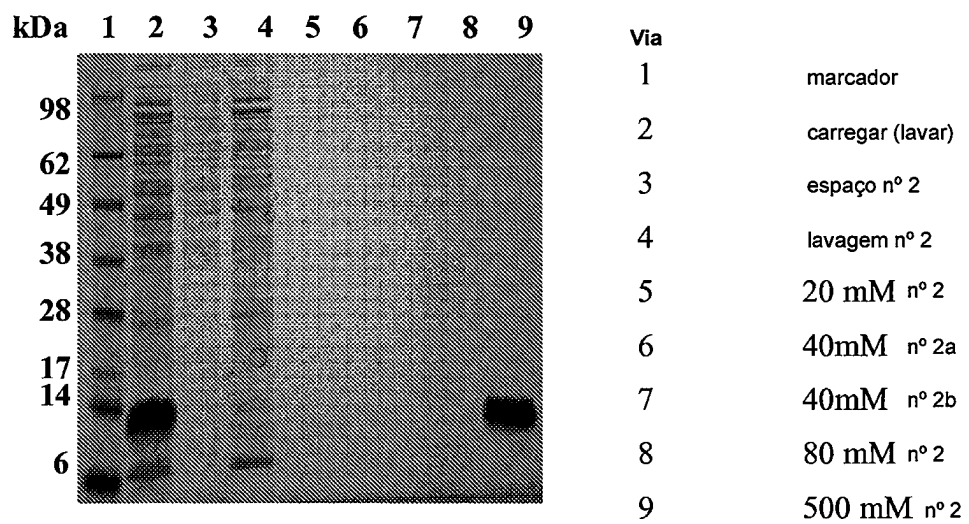
**FIG. 17**

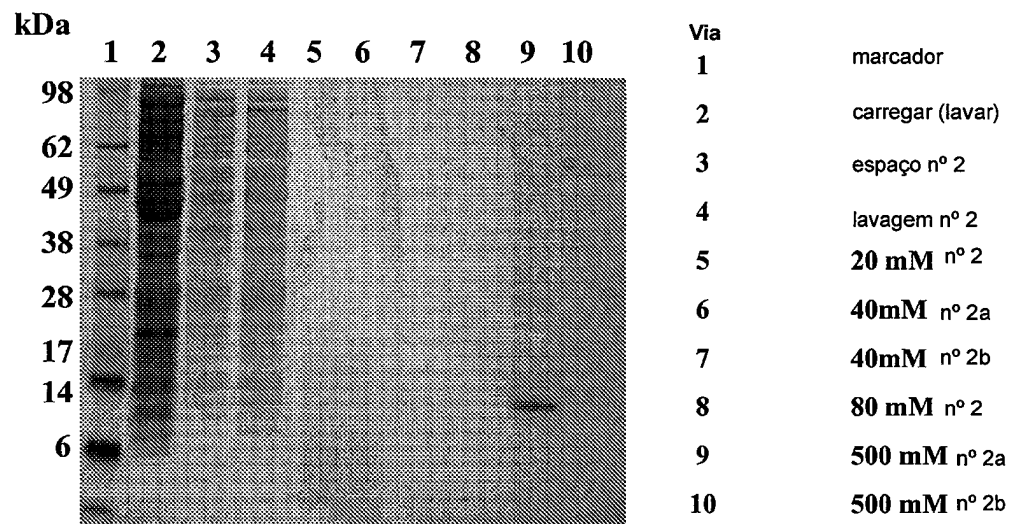
MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRRTNDGRCIPASQCP
 QHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRHVPCTIRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCK
 EDDCPK (SEQ ID NO: 21)

FIG. 18

19/26

19/26

**FIG. 20**

**FIG. 21**

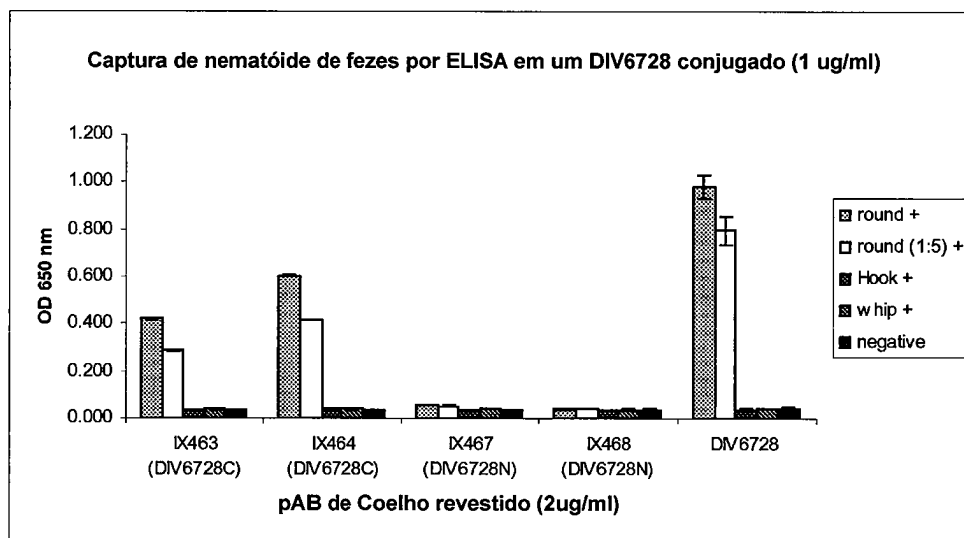
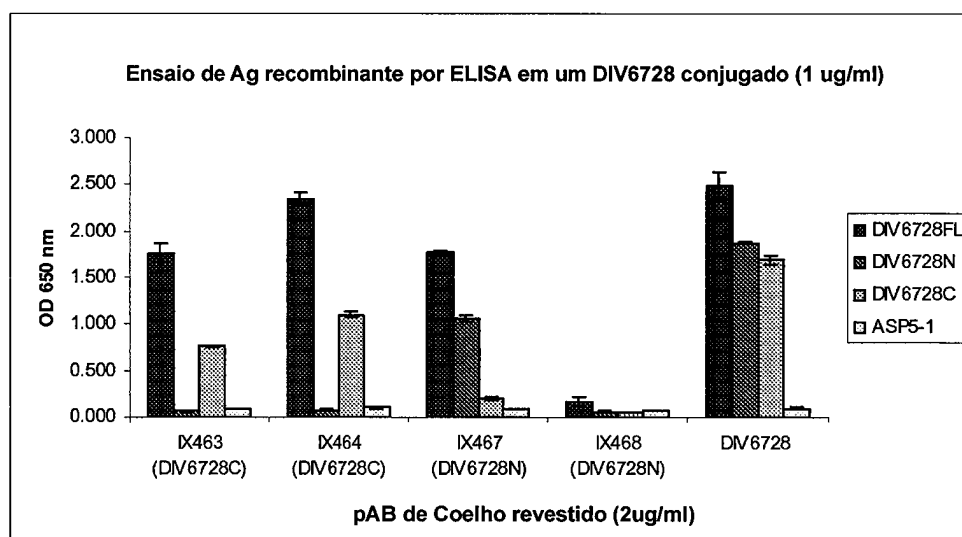


FIG. 22

**FIG. 23**

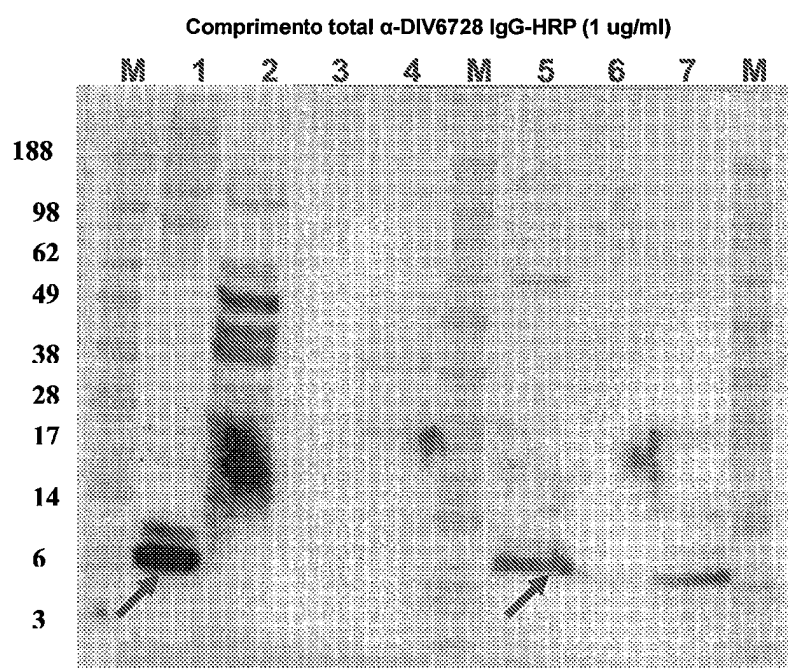


FIG. 24

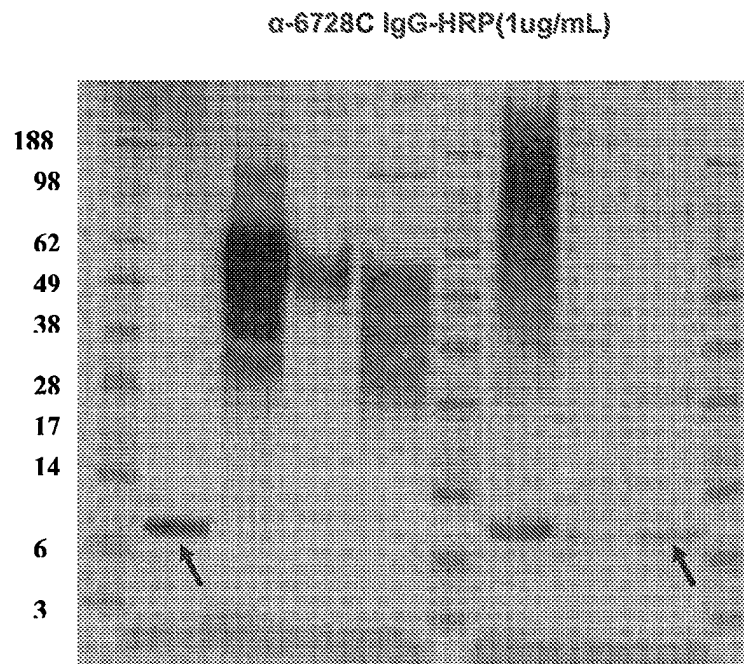
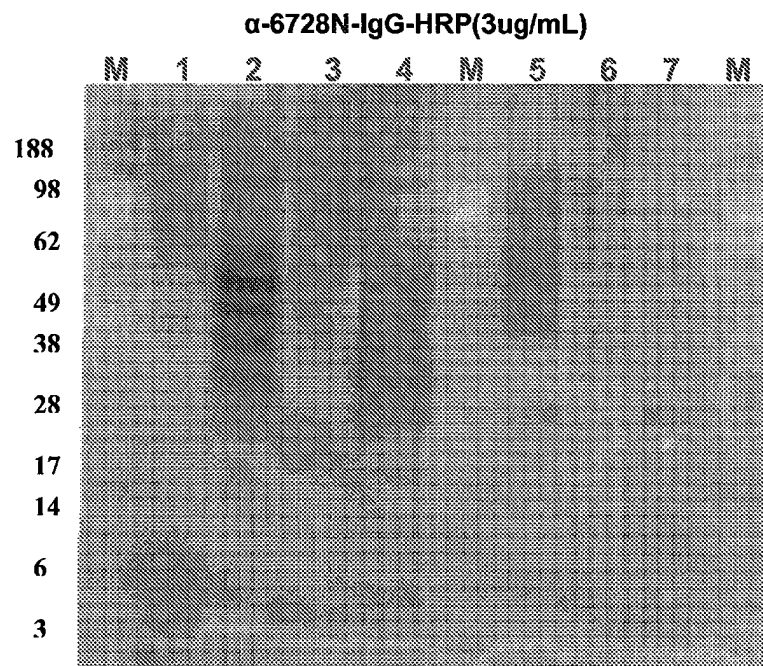


FIG. 25

**FIG. 26**