



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0922964-7 B1



(22) Data do Depósito: 18/05/2009

(45) Data de Concessão: 13/07/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA OU A AUSÊNCIA DE UM OU MAIS ANTÍGENOS DE ANCILOSTOMÍDEO EM UMA AMOSTRA, POLIPEPTÍDEO, ANTICORPO PURIFICADO, DISPOSITIVO, KIT E IMUNOCOMPLEXO

(51) Int.Cl.: A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2008 US 61/122,254.

(73) Titular(es): IDEXX LABORATORIES, INC..

(72) Inventor(es): JINMING GENG; DAVID ALLEN ELSEMORE.

(86) Pedido PCT: PCT US2009044367 de 18/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/068310 de 17/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/06/2011

(57) Resumo: MÉTODOS, DISPOSITIVOS E KITS PARA DETECÇÃO DE ANCILOSTOMÍDEO, BEM COMO POLIPEPTÍDEO COPROASP5 E ANTICORPO PURIFICADO QUE SE LIGA AO MESMO. A presente invenção refere-se a métodos, dispositivos, kits e composições para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeos em uma amostra de material fecal. Os métodos, dispositivos, kits e composições da presente invenção podem ser utilizados para confirmar a presença ou a ausência de ancilostomídeos em uma amostra de material fecal de um mamífero que possa estar também infectado com um ou mais dentre verme cilíndrico (roundworm), verme em forma de chicote (whipworm) e verme do coração (heartworm). A presença ou a ausência de ancilostomídeos no mamífero pode ser confirmada, por exemplo, com a finalidade de selecionar um ciclo ideal para tratar o mamífero e/ou para se determinar se o mamífero livrou-se da infecção após o tratamento ter sido iniciado.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA OU A AUSÊNCIA DE
UM OU MAIS ANTÍGENOS DE ANCILOSTOMÍDEO EM UMA
AMOSTRA, POLIPEPTÍDEO, ANTICORPO PURIFICADO,
DISPOSITIVO, KIT E IMUNOCOMPLEXO”.**

Referência cruzada

[0001] Este pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido de Patente U.S. Provisório N° de série 61/122 254, depositado em 12 de dezembro de 2008 e ao Pedido de Patente U.S. Provisório N° de série 11/763 583, depositado em 15 de junho de 2007, os quais são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

Antecedentes da invenção

Campo da Invenção

[0002] A presente invenção refere-se a composições, dispositivos, kits e métodos para a detecção de ancilostomídeos em mamíferos. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada com polipeptídeos e composições contendo polipeptídeos, anticorpos e composições contendo anticorpos, dispositivos, kits e métodos para detectar a presença ou a ausência de antígeno de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero que possa incluir um ou mais dentre antígeno de *roundworm* (vermes cilíndricos), *whipworm* (verme em forma de chicote) e *heartworm* (verme do coração).

Descrição da técnica anterior

[0003] Ancilostomídeos são parasitas que vivem nos intestinos, alimentando-se de sangue e podem causar a seus hospedeiros sérias enfermidades, tais como anemia, desnutrição e retardo no desenvolvimento. Por exemplo, o ancilostomídeo *Ancylostoma caninum* causa doença significativa tanto em caninos como em seres humanos (Prociv *et al.*, *Acta Trop.* 1996 Sep;62(1):23-44).

[0004] Os métodos atuais para diagnóstico de infecções por

ancilostomídeos envolvem primariamente o exame microscópico de amostras de material fecal, seja diretamente em esfregaços de fezes ou após concentração de ovos por flotação em meios que aumentam a densidade. Apesar de seu procedimento ser altamente adotado, o método possui desvantagens importantes. Estes métodos microscópicos consomem muito tempo, são desagradáveis, requerem equipamento especializado e a sua especificidade pode ser baixa [Dryden *et al.*, 2005, *Vet Therap.* 6(1), 15-28]. Adicionalmente, a exatidão de resultados destes métodos é altamente dependente da capacidade e do conhecimento especializado do operador. (Por exemplo, alguém que tenha pouca experiência em visualização confundirá muitas vezes ovos de outros nematódeos parasitas com aqueles de ancilostomídeos e vice-versa) Esse potencial para diagnóstico equivocado é uma circunstância infeliz uma vez que um animal com diagnóstico errado pode receber um tratamento sem efeito contra ancilostomídeos e, portanto, que não aliviaria o sofrimento do animal ou interromperia a deterioração progressiva de sua saúde.

[0005] O manuseio de material fecal é desagradável e perigoso. Procedimentos sanitários e inofensivos para o processamento de fezes são inconvenientes e frequentemente complexos. Estes procedimentos podem incluir pesar, centrifugar e armazenar, e são difíceis exceto em laboratório clínico equipado com aparelhos adequados, equipamento de proteção e técnico experiente. Portanto, qualquer redução no número de etapas necessárias para realizar um teste em fezes e qualquer redução em contato entre o operador do teste e o material em teste é desejável. Os métodos de imunoensaio têm sido utilizados por laboratórios clínicos para a detecção de vários vírus, bactérias e parasitas não helmintos e organismos em fezes. No entanto, existe ainda necessidade de um método simples de imunoensaio para a detecção de infecção por verme parasitário, e infecção por

ancilostomídeos em especial, em fezes, sangue total ou em soro.

[0006] Outra limitação significativa ao diagnóstico por detecção microscópica de ovos é a de que geralmente não é possível detectar os ovos de ancilostomídeos nas fezes do hospedeiro até bem depois que a infecção se manifesta, não permitindo, assim, a detecção precoce da infecção por ancilostomídeos. Por exemplo, os ovos de ancilostomídeos em geral só surgem em fezes caninas aproximadamente 17 dias após ingestão oral do parasita pelo canino. Essa presença tardia é desfavorável porque sintomas tais como grave perda de peso e diarreia sanguinolenta com frequência afetam o hospedeiro antes que os ovos de ancilostomídeo comecem a surgir nas fezes. A detecção precoce, por conseguinte, é altamente desejável.

Sumário da invenção

[0007] Em uma modalidade, a invenção abrange anticorpos que se ligam especificamente a um polipeptídeo incluindo toda ou uma parte antigênica da sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NOS:1 e 2, como listadas neste pedido de patente, ou a um polipeptídeo incluindo uma sequência que é uma variante conservadora de uma destas sequências. Em outra modalidade, os anticorpos se ligam especificamente a antígeno de mamíferos infestados por ancilostomídeos, porém não se ligam especificamente a antígeno de mamíferos infestados com vermes cilíndricos, vermes com chicote e/ou verme do coração.

[0008] Em outra modalidade, a invenção abrange anticorpos que são obtidos por imunização com o polipeptídeo incluindo toda ou uma parte antigênica da sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NOS:1 e 2, ou com um polipeptídeo incluindo uma sequência que é uma variante conservadora de uma destas sequências.

[0009] Em ainda outra modalidade, a invenção provê um dispositivo para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeos em uma

amostra de um mamífero, compreendendo um suporte sólido, em que um ou mais dos anticorpos da invenção estão imobilizados no suporte sólido. O dispositivo pode ser, mas sem limitar-se a, um dispositivo para teste pela técnica ELISA, tal como um dispositivo para imunoensaio de fluxo lateral ou um dispositivo para microtitulação em placa. As amostras de mamífero que podem ser testadas para ancilostomídeos pelo dispositivo incluem, entre outras, fezes, sangue total, soro, leite mamário e tecido, tal como tecido do sistema respiratório, da glândula mamária, de mucosa, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, muscular e dos olhos, por exemplo. O dispositivo pode compreender ainda, porém não necessita incluir, um ou mais reagentes para a detecção de um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais parasitas de vermes diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

[00010] Em ainda outra modalidade, a invenção provê um método para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo, tal como *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Ancylostoma pluridentatum*, *Necator americanus* e *Uncinaria stenocephala*, por exemplo, em uma amostra obtida de um mamífero, tal como canino, felino, suíno, bovino ou ser humano. Em uma modalidade, o método é realizado para testar uma amostra fecal quanto à presença de coproantígeno de ancilostomídeos. O método, contudo, não se limita a ser realizado para testar uma amostra de material fecal. Além de fezes, a amostra pode ser, portanto, entre outras, de sangue total, soro, leite mamário e tecido, tal como tecido do sistema respiratório, da glândula mamária, de mucosa, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, muscular ou de olhos, por exemplo. As etapas do método incluem pôr a amostra em contato com um ou

mais dos anticorpos da invenção e detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeos, tais como os polipeptídeos da invenção, por exemplo, ou detectar a presença ou a ausência de um ou mais complexos que incluam um ou mais antígenos de ancilostomídeos e um ou mais anticorpos da invenção. O método pode incluir ainda uma ou mais das etapas opcionais de diagnosticar no mamífero a existência ou não de infecção por ancilostomídeos e determinar se um ácido nucleico de ancilostomídeo está presente na mesma amostra que esteve em contato com os anticorpos com a finalidade de detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeos, ou em alguma outra amostra do mamífero. O método pode ser utilizado também para teste de contaminação ambiental por ancilostomídeos. Amostras ambientais que podem ser testadas quanto a ancilostomídeos pelo dispositivo incluem, entre outras, de solo, material em decomposição ou matéria fecal de ambientes residenciais incluindo pátios, jardins, caixas de areia e parquinhos infantis. Locais para teste podem incluir também parques, praias, florestas, fazendas ou outros lugares expostos ao material fecal de cachorros, gatos ou de outros mamíferos hospedeiros de ancilostomídeos. Fezes provenientes de caixas de areia para gatos, de uso interno ou externo, podem ser testadas também.

[00011] Em ainda outra modalidade, a presente invenção inclui um kit para condução de uma ou mais etapas do método da invenção. O kit pode incluir opcionalmente, por exemplo, o dispositivo e uma ou mais das composições da presente invenção e instruções para executar o método da presente invenção. O kit pode incluir ainda opcionalmente, por exemplo, um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos para 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 a serem utilizados como parte do dispositivo e/ou

a serem usado na execução do método.

Descrição resumida dos desenhos

[00012] A figura 1 apresenta dados de espectroscopia de massa, identificando o fragmento de 28 kDa como o fragmento N-terminal de ASP5 (SEQ ID NO: 5). MS peptídeos 1-4 são SEQ ID NOs: 6-9, respectivamente.

[00013] A figura 2 apresenta uma análise por Western Blotting, mostrando a ligação de anti-Ac-ASP-5 pAB a um produto de aproximadamente 56 kDa em extrato de ancilostomídeo inteiro.

[00014] A figura 3 apresenta determinações da OD de amostras fecais caninas agrupadas para indicar a especificidade do anti-ASP5-1 pAB por ancilostomídeo.

[00015] A figura 4 apresenta determinações isoladas da OD de anti-ASP5-1 pAB sobre um período de 111 para caninos infectados com ancilostomídeo.

[00016] A figura 5 apresenta determinações isoladas da OD de anti-ASP5-1 pAB sobre um período de 52 dias para caninos infectados com o ancilostomídeo *Uncinaria stenocephala*.

[00017] A figura 6 apresenta determinações isoladas da OD de anti-ASP5-1 pAB sobre um período de 52 dias para felinos infectados com o ancilostomídeo *Ancylostoma tubaeformae*.

Descrição detalhada das concretizações preferidas da invenção

I. Introdução

[00018] A presente invenção é dirigida em geral a métodos, dispositivos, kits e composições para detectar ancilostomídeo em uma amostra, a qual pode ser, por exemplo, amostra fecal obtida de um mamífero ou de algo que esteve em contato com uma amostra fecal mamífera, tal como, solo, areia, grama, folhas, material em decomposição, etc. A presente invenção refere-se a antígenos de ancilostomídeos do gênero *Ancylostoma*, tais como *Ancylostoma*

caninum, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Ancylostoma pluriidentatum*, por exemplo. A presente invenção refere-se também a antígenos de ancilostomídeo do gênero *Necator*, tais como *Necator americanus*, por exemplo, e do *Uncinaria*, tal como *Uncinaria stenocephala*, por exemplo. Em especial, a presente invenção está relacionada com polipeptídeos e suas variantes conservadoras, polinucleotídeos que codificam estes polipeptídeos e oligonucleotídeos que se ligam especificamente a estes polinucleotídeos, anticorpos que são criados e se ligam especificamente a estes polipeptídeos e com métodos, dispositivos, composições e kits para detectar ancilostomídeo, tal como os dos gêneros *Ancylostoma*, *Necator* e *Uncinaria*, por exemplo.

[00019] A presente invenção é fundamentada em parte na descoberta de propriedades inesperadas de composições da presente invenção. Especificamente, foi determinado que um anticorpo da presente invenção criado contra um polipeptídeo da presente invenção pode ser utilizado para capturar e detectar antígenos de ancilostomídeos em um mamífero, mesmo quando o mamífero está infestado também por um ou mais entre *roundworm* (verme cilíndrico), *whipworm* (verme em forma de chicote) e *heartworm* (verme do coração). Essa especificidade por ancilostomídeo é surpreendente, pois ancilostomídeos, vermes-chicotes, vermes cilindros e vermes do coração são todos nematódeos relacionados, e seria de se esperar que um anticorpo criado contra uma proteína isolada de qualquer um destes vermes reagisse em modo cruzado com um ou mais dos outros vermes, antígenos do hospedeiro ou outros componentes do hospedeiro.

[00020] Foi ainda determinado que, este anticorpo pode ser utilizado para capturar e detectar ancilostomídeo em um mamífero tão precocemente como em 9 dias após o mamífero ser infectado pela

primeira vez com ancilostomídeo. Essa capacidade para detectar ancilostomídeo tão cedo após a infecção é surpreendente uma vez que os ovos de ancilostomídeo geralmente não surgem nas fezes de um hospedeiro infeccioso até aproximadamente 17 dias depois que o hospedeiro torna-se infectado.

[00021] A presente invenção inclui, portanto, métodos, dispositivos, composições e kits que fazem uso de anticorpos e/ou de seus fragmentos para capturar e detectar especificamente ancilostomídeo em um mamífero que pode também ser infestado por um ou mais entre verme-chicote, ancilostomídeo e verme do coração. A capacidade da presente invenção para detectar e diagnosticar ancilostomídeo, mesmo quando um ou mais outros tipos de vermes estão também presentes, oferece àquele que cuida do mamífero a oportunidade de selecionar do modo mais adequado um tratamento para que o mamífero se livre do ancilostomídeo. Além disso, a capacidade da presente invenção para, em alguns casos, detectar ancilostomídeo já em 9 dias depois que o mamífero é infectado pela primeira vez possibilita que o responsável pelo seu cuidado possa iniciar este tratamento antes que o ancilostomídeo torne o mamífero gravemente doente. Uma intervenção anterior ao aparecimento de ovos nas fezes reduziria também em grande medida ou eliminaria a possibilidade de que a infestação fosse disseminada para outros animais ou seres humanos.

II. Definições e usos de termos

[00022] O termo "composições da invenção" refere-se a todos os ácidos nucleicos, polipeptídeos, anticorpos e misturas que incluem um ou mais daqueles ácidos nucleicos, polipeptídeos e anticorpos e um ou mais outros compostos, que podem ser utilizados para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em uma amostra obtida de um mamífero ao se executar o método da presente invenção, que são explicitamente descritos, implicitamente abrangidos ou de outra forma

descritos neste pedido de patente.

[00023] "Amostra de um mamífero" na qual ancilostomídeo pode ser detectado pela presente invenção inclui todos os componentes corporais e seus extratos, tais como qualquer líquido, sólido, célula ou tecido, que sejam capazes de conter antígeno de ancilostomídeos. Amostras exemplares, portanto, incluem, entre outras, de fezes, leite, sangue total e partes do mesmo, incluindo soro, e incluem ainda extratos de tecidos, incluindo tecido do sistema respiratório, da glândula mamária, de mucosa, intestino, fígado, coração, esôfago, cérebro, muscular e de olhos, por exemplo. A amostra pode ser coletada diretamente do mamífero ou pode ser coletada de algo que esteve em contato com o mamífero ou, por outro lado, qualquer parte do mamífero que esteve em contato com a amostra. Por exemplo, a amostra pode ser fresca ou de excrementos fecais em decomposição do mamífero. Como outro exemplo, a amostra pode incluir de solo, sujeira, areia, material de plantas ou de qualquer outro material que possa estar misturado com componentes corporais que tenham sido deixados para trás por um mamífero, tal como fezes, por exemplo. Como outro exemplo, a amostra pode ser o muco na extremidade terminal do trato digestivo que entrou em contato com as fezes do mamífero. Independentemente da sua origem ou do seu conteúdo, esta amostra é às vezes denominada, neste relatório descritivo, a "amostra de mamífero", a "amostra testada" ou a "amostra em teste".

[00024] Como usado nesse relatório descritivo, "ácido nucleico" é sinônimo e, portanto, utilizado alternadamente com "gene", "DNA", "cDNA", "EST", "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", "ácido polinucleico", "RNA" e "mRNA". Um ácido nucleico pode estar na forma de fita dupla ou pode estar em forma de fita simples. Adicionalmente, um ácido nucleico é isolado em forma natural, tal como de um ancilostomídeo inteiro ou de parte do mesmo, por exemplo, ou é

sintetizado artificialmente, quer em organismo hospedeiro recombinante ou por quaisquer outros meios artificiais conhecidos daquele versado na técnica como, por exemplo, empregando uma técnica à base de PCR, criando um organismo transgênico que sintetiza o ácido nucleico, usando uma máquina de síntese de DNA ou por qualquer outra técnica de base molecular, por exemplo.

[00025] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são termos sinônimos utilizados alternadamente neste relatório descritivo com referência a um polímero de resíduos de aminoácidos. Um polipeptídeo, peptídeo e proteína da presente invenção podem ser isolados em forma natural, tal como de um ancilostomídeo inteiro ou uma parte de ancilostomídeo, por exemplo, ou sintetizados artificialmente, quer em organismo hospedeiro recombinante ou por outros meios artificiais conhecidos daquele versado na técnica.

[00026] O termo "anticorpo" ou "anticorpo da presente invenção" refere-se a qualquer anticorpo que seja capaz de ligar-se especificamente a um ou a mais antígenos de ancilostomídeo, porém não a qualquer antígeno de verme cilíndrico, verme-chicote ou verme do coração. Os anticorpos da presente invenção podem ser criados contra um ou mais polipeptídeos imunogênicos da presente invenção. A não ser se afirmado de outra forma, deverá ser entendido que o anticorpo da presente invenção pode incluir uma mistura de dois ou mais tipos diferentes de anticorpo. Por exemplo, o anticorpo pode ser uma mistura de dois tipos de anticorpos, em que um dos dois tipos liga-se especificamente a um determinado antígeno e o outro dos dois tipos liga-se especificamente a algum outro antígeno.

[00027] O "polipeptídeo imunogênico da presente invenção" e, mais simplesmente, "o polipeptídeo da presente invenção", é um imunogênio contra o qual os anticorpos da presente invenção podem ser criados. Todos os "polipeptídeos da presente invenção" são imunogênicos e,

portanto, podem ser utilizados para induzir uma resposta imune em animal hospedeiro para produção dos anticorpos da presente invenção. A não ser se afirmado de outra forma, deverá ser entendido que o polipeptídeo da presente invenção pode ser um componente de uma composição mista de uma pluralidade de componentes.

[00028] "Imunogênio" é qualquer agente, tal como o polipeptídeo imunogênico da presente invenção, por exemplo, que seja capaz de induzir uma resposta imune em um animal quando exposto àquele agente.

[00029] O termo "ancilostomídeo", neste relatório descritivo, refere-se a helmintos tais como ancilostomídeos intestinais da ordem *Strongiloidae* e família *Ancylostomatidae*, a qual inclui os gêneros *Ancylostoma*, *Uncinaria* e *Necator*. Por conseguinte, o termo "ancilostomídeo", neste relatório descritivo, não se refere à totalidade do filo *Nematoda*. Por exemplo, "ancilostomídeo" não inclui qualquer membro dos gêneros *Trichuris*, *Dirofilaria*, *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris* ou *Ascaris*.

[00030] "Coproantígeno de ancilostomídeo" é qualquer produto de ancilostomídeos que esteja presente nas fezes de um mamífero com infecção por ancilostomídeos e que possa ser ligado especificamente por um ou mais dos anticorpos da invenção. Por exemplo, um coproantígeno de ancilostomídeo pode ser, mas sem se limitar a, um ou mais dos polipeptídeos da invenção. Os presentes inventores determinaram que uma nova isoforma de 28 kDa em N-terminal de ASP5, a qual é uma proteína excretora/secretora de *Ancylostoma*, já está presente em fezes de caninos infectados com *Ancylostoma* em 9 dias depois que os caninos se infectaram pela primeira vez com o *Ancylostoma*. Por conseguinte, um "coproantígeno de ancilostomídeo" pode ser esta nova isoforma de 28 kDa em N-terminal de ASP5 (a qual é denominada neste relatório descritivo "CoproASP5") que foi

observada em fezes caninas pelos presentes inventores.

[00031] "Específico por", "liga-se especificamente" e "liga-se estavelmente" significa 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 único outro agente. A título de exemplo, um anticorpo da presente invenção é dito "específico por", que "liga-se especificamente" e que "liga-se estavelmente" a antígenos de ancilostomídeo sempre que aquele anticorpo for capaz de reconhecer e de se ligar àqueles antígenos de ancilostomídeo com maior afinidade do que por quaisquer outros antígenos de um verme parasitário diferente de ancilostomídeos. Tal especificidade de ligação pode ser testada utilizando metodologia bem conhecida no estado da técnica, por exemplo, ensaio por ELISA ou radioimunoensaio (RIA). Com base na informação observada referente à especificidade de ligação de uma determinada composição da invenção, o método da presente invenção pode ser executado sob condições que permitam àquela composição ligar-se (e, por conseguinte, permite a detecção de tal ligação) a um ou mais agentes específicos, porém não se ligar significativamente a outros agentes, embora aquelas condições sejam mantidas. A título de exemplo, o método da presente invenção pode ser executado sob condições que permitam a um anticorpo da presente invenção ligar-se (e, por conseguinte, permite a detecção de tal ligação) a um ou mais antígenos de ancilostomídeo presentes em determinada amostra, porém não significativamente a qualquer antígeno de verme cilíndrico, verme-chicote ou verme do coração que possa estar presente naquela amostra.

[00032] "Detectar ancilostomídeo" significa detectar um ou mais produtos específicos de ancilostomídeos, incluindo um ou mais dos

polipeptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos da presente invenção, um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou CoproASP5, por exemplo. A presença de um ou mais destes produtos de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero é indicativa de que o mamífero apresenta infecção por ancilostomídeo, não obstante qualquer organismo ancilostomídeo inteiro, ovo ou outra parte deste estar também presente ou não naquela amostra. Por outro lado, a ausência de um ou mais destes produtos de ancilostomídeo em uma amostra de um mamífero é indicativa de que o mamífero não apresenta infecção por ancilostomídeo.

[00033] "Aminoácido" refere-se a aminoácidos naturais e aminoácidos sintéticos. Resíduos de aminoácidos são abreviados como segue: 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 Cys; Ácido Glutâmico é E ou Glu; Glutamina é Q ou Gln; Glicina é G ou Gly; Histidina é H ou His; Isoleucina é I ou Ile; Leucina é L ou Leu; Lisina é K ou Lys; Metionina é M ou Met; Fenilalanina é F ou Phe; Prolina é P ou Pro; Serina é S ou Ser; Treonina é T ou Thr; Triptofano é W ou Trp; Tirosina é Y ou Tyr; e Valina é V ou Val. Exceto quando definido de outra forma neste relatório descritivo, X ou Xaa representa qualquer aminoácido. Outros aminoácidos pertinentes incluem, entre outros, 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina. Em todos os casos, a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo descrito ou de outra forma referido neste relatório descritivo é apresentada em forma convencional, em que o resíduo de aminoácido mais à esquerda, ou primeiro, da sequência é o resíduo N-terminal, e o resíduo de aminoácido mais à direita, ou último, da sequência é o resíduo C-terminal.

[00034] "Variante conservadora" de qualquer sequência específica de ácido nucleico inclui qualquer sequência com uma ou mais substituições de códon que degenera aquela sequência de ácido

nucleico em particular, qualquer sequência com uma ou mais substituições, inserções e deleções de nucleotídeos daquela sequência de ácido nucleico em particular e a sequência complementar daquele ácido nucleico em particular e as variantes conservadoras daquela sequência complementar. Variantes conservadoras de uma sequência de ácido nucleico em particular exibem, de preferência, pelo menos aproximadamente 85% de identidade, mais preferivelmente exibem pelo menos aproximadamente 90% de identidade e mesmo mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 95-99% de identidade com aquela sequência de ácido nucleico em particular. Variantes conservadoras de uma sequência de ácido nucleico em particular podem ser sintetizadas artificialmente ou podem ser isoladas em sua forma natural de um organismo, incluindo de um organismo ancilostomídeo, tal como *Ancylostoma caninum*, por exemplo.

[00035] "Variante conservadora" de qualquer sequência polipeptídica específica é qualquer polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos que varia da sequência de aminoácidos daquele polipeptídeo em particular, porém que ainda retém as propriedades de ligação específica daquele polipeptídeo em particular, de modo que um anticorpo da presente invenção que seja criado contra o polipeptídeo em particular é capaz de ligar-se especificamente ao polipeptídeo variante. Por conseguinte, por exemplo, uma variante conservadora de um polipeptídeo em particular pode apresentar uma ou mais substituições, deleções, adições e inserções de aminoácido com relação àquele polipeptídeo em particular. Por exemplo, uma variante conservada de um polipeptídeo em particular pode conter 30 ou menos, conter 25 ou menos, conter 20 ou menos, conter 15 ou menos, conter 10 ou menos, conter 5 ou menos substituições conservadas de aminoácido com relação àquele polipeptídeo em particular. Variantes conservadoras de um polipeptídeo em particular exibem de preferência,

porém não essencialmente, pelo menos aproximadamente 80% de identidade, mais preferivelmente exibem pelo menos aproximadamente 90% de identidade e ainda mais preferivelmente exibem pelo menos aproximadamente 91-99% de identidade com aquele polipeptídeo em particular. O percentual de identidade de qualquer sequência de ácido nucleico ou de aminoácidos de interesse (por exemplo, qualquer um dos polipeptídeos descritos neste relatório) relativamente à outra sequência-alvo de ácido nucleico ou de aminoácidos pode ser determinado como segue. Em primeiro lugar, uma sequência-alvo de ácido nucleico ou de aminoácidos da invenção pode ser comparada e alinhada a uma sequência de ácido nucleico ou de aminoácidos de interesse, usando o programa *BLAST 2 Sequences* (Bl2seq) da versão independente de BLASTZ contendo BLASTN e BLASTP (por exemplo, versão 2.0.14). A versão independente de BLASTZ pode ser obtida no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov. Instruções explicativas sobre como utilizar o BLASTZ e, especificamente, o programa Bl2seq, podem ser encontradas na pasta "*readme*" que acompanha o BLASTZ. Os programas são descritos também detalhadamente por Karlin *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264; Karlin *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873; e Altschul *et al.* (1997) *Nucl. Acids Res.* 25:3389.

[00036] "CoproASP5" refere-se a um fragmento de 28 Kd em N-terminal 28kD de ASP5 encontrado em fezes de mamíferos.

[00037] O programa Bl2seq compara a sequência de interesse e uma sequência-alvo utilizando o algoritmo BLASTN (usado para comparar sequências de ácido nucleico) ou o BLASTP (usado para comparar sequências de aminoácidos). Tipicamente, os parâmetros padrão de uma matriz de pontuação BLOSUM62, custo de existência de lacuna de 11 e custo de extensão de 1, tamanho de palavra de 3, valor previsto de 10, custo por resíduo de 1 e razão lambda de 0,85, são utilizados ao serem alinhadas sequência de aminoácidos. O arquivo de saída contém

regiões alinhadas de homologia entre a sequência-alvo e a sequência de interesse. Uma vez alinhadas, o tamanho é determinado por contagem do número de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos consecutivos (ou seja, excluindo lacunas) da sequência-alvo que se alinham em sequência com a sequência de interesse, iniciando com qualquer posição de igualdade e finalizando com qualquer outra posição de igualdade. Posição de igualdade representa qualquer posição em que um nucleotídeo ou resíduo de aminoácido idêntico está presente tanto na sequência-alvo como na de interesse. Lacunas de um ou mais resíduos podem ser inseridos em uma sequência-alvo ou de interesse para maximizar alinhamentos de sequências entre domínios estruturalmente conservados (por exemplo, hélices α , folhas β e alças).

[00038] O percentual de identidade sobre um tamanho específico é determinado pela contagem do número de posições de igualdade sobre aquele tamanho específico, dividindo aquele número pelo tamanho e multiplicando o valor resultante por 100. Por exemplo, se (i) uma sequência-alvo de 500 aminoácidos é comparada a uma sequência de aminoácidos de interesse, (ii) o programa BL2seq apresenta 200 aminoácidos da sequência-alvo alinhados com a região da sequência de interesse, em que o primeiro e o último aminoácido daquela região de 200 aminoácidos são iguais, e (iii) o número de igualdades sobre aqueles 200 aminoácidos alinhados é de 180, então, a sequência-alvo de 500 aminoácidos contém um tamanho de 200 e a identidade de sequência sobre aquele tamanho é de 90% (ou seja, $180/200 \times 100 = 90$). Será apreciado que uma sequência-alvo de ácido nucleico ou aminoácido que se alinha com uma sequência de interesse pode resultar em muitos diferentes tamanhos, tendo cada tamanho o seu próprio percentual de identidade. Cabe observar que o valor de percentual de identidade pode ser arredondado para a casa decimal mais próxima. Por exemplo, 78,11; 78,12; 78,13 e 78,14 são

arredondados para baixo para 78,1, enquanto 78,15; 78,16; 78,17; 78,18 e 78,19 são arredondados para cima para 78,2. Cabe observar também que o valor de tamanho é sempre um número inteiro.

[00039] Variantes conservadoras de uma determinada sequência polipeptídica podem ser sintetizadas artificialmente ou podem ser isoladas em sua forma natural de um organismo, incluindo de um organismo ancilostomídeo, tal como *Ancylostoma caninum*, por exemplo. O técnico versado no assunto reconhecerá que estas variantes conservadoras incluem, entre outras, aquelas sequências com uma ou mais substituições de resíduos de aminoácido básico, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácido ácido, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácido polar, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácido hidrofóbico, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos aromáticos e uma ou mais substituições de resíduos de pequeno aminoácido (Os resíduos de aminoácido "básico" são K, R e H. Os resíduos de aminoácido "ácido" são D e E. Os resíduos de aminoácido "polar" são N e Q. Os resíduos de aminoácido "hidrofóbico" são I, L e V. Os resíduos de aminoácido "aromáticos" são F, Y e W. Os "pequenos" aminoácidos são G, S, A, T e M).

I. Ácidos nucleicos e polipeptídeos da invenção

[00040] Os ácidos nucleicos e polipeptídeos da invenção estão descritos detalhadamente no Pedido de Patente Provisório: "*Methods, Devices, Kits And Compositions For Detecting Hookworm*", Pedido de Patente Provisório Nº de série 61/122 254, depositado em 12 de dezembro de 2008, o qual é aqui incorporado em sua totalidade por referência neste pedido de patente.

[00041] Previamente, Zhan e colaboradores descreveram a identificação molecular e uma caracterização parcial de ASP-5, a qual é uma proteína excretora/secretora de *Ancylostoma* (Consultar Zhan *et*

al., International Journal for Parasitology 33:897-907 (2003)). Em seus estudos, o grupo de Zhan descreveu uma forma única da proteína ASP-5 com massa de aproximadamente 56 kDa, secretada por parasitas cultivados *in vitro*. A proteína ASP-5, incluindo um *tag* (etiqueta) His6 em N-terminal (SEQ ID NO:2) pode ser codificada pela sequência nucleica indicada por SED ID NO:1:

```

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
CG
CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGG
ATCCGAATTCGAGCTCACCCTTGTCCAGGAAATGATCTAACAGATGCT
GAACGCACACTGCTAACTAGGGTGCACAATTCCATTGACGGGAAATAG
CGCAAGGAGTTGCAAACAACTACCATGGTGGTAACTGCCTGCTGGAAA
GAACATATACAGGATGAGATACAGCTGTGAGCTGGAACAGGCTGCTATT
GATGCTAGTCAAACCTTCTGTTCCGCATCATTGGAGGAACACAGAAAT
ATGGACA
AAACATCCAAGCATACGTCACACCATCTATAATCGCTCGCCCGAAAAAC
G
ACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCTGCCTGTTATCTACTAC
GGCCAACGCGACGCGGCCAACAAGTTCACCGATCCGCGCTTGTACACA
TT
TGCAAACCTCGCCTACGACAAGAACAACACTGCACTTGGCTGTCACTATGCG
A
AATGTCAAGGCCCTGACAGAATCGTCATTAGTTGCATGTACAACAACGT
C
GTTCTGACAACGCTGTGATCTACGAGCCAGGAACTGCTTGCGTAAAAG
A
TCAGGACTGCACTACTTATCCTCAGTCCACATGCAAGGACAGCCTTTGC
A
TTATTCCTACGCCACATCCACCAAATCCACCAAATCCACCACCTGCAAT
G
TGTCCAAACGCTGAAATGACTGATGCAGCACGAAAGAAGGTCCTCGACA
T

```

GCACAACTGGCGCAGATCGCAGCTCGCTCTGGGAAACGTTCAAAACGG
GA
AAAATGCTTACAACCTGCCCCACTGCAACAGACATGTACAAGATGGAATA
T
GATTGCGACCTCGAGAACAGCGCTCTAGCGTATGCAAAGCAATGTAGTC
T
CGTTGGTTCAGCAGAAGGAACTCGTCCAGGAGAAGGCGAGAATGTCCA
CA
AAGGCGCTCTCGTAACCGATCCGGAGGCTGCAGTTCAGACCGCAGTTC
AA
GCATGGTGGAGTCAAATCTCACAAAATGGACTCAATGCACAGATGAAAT
T
CACTGCTTTCTTGAAGGACAAGCCTGACGCTCCGACAGCGTTTACACAG
A
TGGCGTGGGCCAAATCCGTAAAGCTTGGATGTGCTGTCTCTAATTGTCA
G
GCAGATACCTTCACCGTCTGTAGATACAAAGCTGCCGGAAACATCGTGG
G
CGAATTCATCTATACCAAGGGAAATGTATGCGACGCCTGTAAAGCCACA
T
GCATTACCGCGGAAGGTCTTTGCCCAACGCCTTGAGCGGCCGC (SEQ
ID NO: 1)

[00042] Os primeiros 114 ácidos nucleicos da SEQ ID NO:1 são derivados de um vetor de clonagem, e o técnico versado no assunto apreciará que esta parte pode ser omitida ou substituída com outras sequências adequadas.

[00043] O polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO:1 possui a seguinte sequência de aminoácidos:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELTTCPGNDLTD
AERTLLTRVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIYRMRYSCLEQAIDA
SQTFCASLEEPQKYGQNIQAYVTPSIARPKNDLLEDAVKQWYLPVIYYGQ
RDAANKFTDPRLYTFANLAYDKNTALGCHYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPD

NAVIYEPGTACVKDQDCTTYPQSTCKDSLIIPTPHPPNPPNPPAMCPNA
 EMTDAARKKVLDMHNWRRSQLALGNVQNGKNAYNCPTATDMYKMEYDC
 DLENSALAYAKQCSLVGSAEGTRPGEGENVHKGALVTDPEAAVQTAVQA
 WWSQISQNGLNAMKFTAFLKDKPDAPTAFTQMAWAKSVKLGCAVSNCQ
 ADTFTVCRYKAAGNIVGEFIYTKGNVCDACKATCITAEGLCPTP (SEQ ID
 NO: 3).

[00044] Os primeiros 38 aminoácidos da SEQ ID NO:3 são derivados de um vetor de clonagem, e o técnico versado no assunto apreciará que esta parte pode ser omitida ou substituída com outros parceiros de fusão adequados.

[00045] Tentando identificar ferramentas para capturar e detectar ancilostomídeo e/ou antígeno de ancilostomídeo em mamíferos infectados por ancilostomídeos, os presente inventores determinaram que somente uma parte truncada (de aproximadamente 28 kDa) da proteína completa (56 kDa) e, portanto, não a versão de 56 kDa, está presente nas fezes de caninos que estão infectados por *Ancylostoma* (Esta parte truncada de 28 kDa de ASP5 é denominada neste relatório descritivo "CoproASP5"; a detecção de CoproASP5 em fezes de caninos infectados por *Ancylostoma* está descrita na seção de exemplos incluída neste relatório descritivo). Em uma modalidade, portanto, a presente invenção provê polipeptídeos que podem ser utilizados para gerar anticorpos a serem utilizados para capturar e detectar CoproASP5 de modo robusto. Um destes polipeptídeos que pode ser utilizado para gerar anticorpos a ser utilizado para ligar CoproASP5 é denominado polipeptídeo ASP5-1, o qual pode ser codificado pela sequência de ácido nucleico abaixo:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
 CGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCG
 GGATCCGAATTCGAGCTCACCCTTGTCCAGGAAATGATCTAACAGATG
 CTGAACGCACACTGCTAACTAGGGTGCACAATTCCATTCGACGGGAAAT
 AGCGCAAGGAGTTGCAAACAACCTACCATGGTGGTAAACTGCCTGCTGG

AAAGAACATATACAGGATGAGATACAGCTGTGAGCTGGAACAGGCTGCT
 ATTGATGCTAGTCAAACCTTCTGTTCCGCATCATTGGAGGAACCACAGA
 AATATGGACAAAACATCCAAGCATACGTCACACCATCTATAATCGCTCG
 CCCGAAAAACGACCTTCTTGAAGATGCAGTGAAACAATGGTATCTGCCT
 GTTATCTACTACGGCCAGCGCGACGCGGCCAACAAGTTTACGGATCCG
 CGCTTGTACACATTTGCAAACCTCGCCTACGACAAGAACTGCACTTG
 GCTGTCACTATGCGAAATGTCAAGGCCCTGACAGAATCGTCATTAGTTG
 CATGTACAACAACGTCGTTCTGACAACGCAGTGATCTACGAGCCTGGA
 ACTGCTTGCGTAAAAGATGCGGACTGCACTACTTATCCTCAGTCCACAT
 GCAAGGACAGCCTTTGCATTATTCCTACGCCACATCCACCAAATCCACC
 AAATCCACCACCAGCAATGAGTCCATGAGCGGCCGC (SEQ ID NO: 2)

[00046] Um técnico no assunto apreciará que devido à degeneração do código genético, outras sequências de ácido nucleico, diferentes de SEQ ID NO:2, podem codificar o polipeptídeo da SEQ ID NO:4 se substituições apropriadas (silenciosas) de códons forem feitas.

[00047] O polipeptídeo ASP5-1 correspondente possui a seguinte sequência de aminoácidos:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELTTCPGNDLTD
 AERTLLTRVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIYRMRYSCLEQAIDA
 SQTFCSASLEEPQKYGQNIQAYVTPSIARPKNDLLEDAVKQWYLPVIYYGQ
 RDAANKFTDPRLYTFANLAYDKNTALGCHYAKCQGPDRIVISCMYNNVVPD
 NAVIYEPGTACVKDADCTTYPQSTCKDSLIIPTPHPPNPPNPPAMSP
 (SEQ ID NO: 4)

[00048] Em uma concretização, o polipeptídeo da invenção inclui uma sequência de aminoácidos que é idêntica ou homóloga a uma sequência representada por SEQ ID NO:4. Um método exemplar para criar o polipeptídeo com a SEQ ID NO:4, que inclua uma sequência de aminoácidos derivada de vetor e inclua também uma sequência de aminoácidos derivada de *Ancylostoma caninum*, está descrito na seção de exemplos incluída neste relatório descritivo.

[00049] Pelo fato de os primeiros 38 resíduos de aminoácido do polipeptídeo com a sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ

ID NO:4 não serem derivados de *Ancylostoma* (ou seja, eles são uma sequência do vetor), é ainda contemplado que o peptídeo da presente invenção possa incluir uma sequência de aminoácidos que seja idêntica ou homóloga a uma sequência representada por SEQ ID NO:4, em que X na posição 1 é M ou está ausente, o X na posição 2 é G ou está ausente, o X na posição 3 é S ou está ausente, o X na posição 4 é S ou está ausente, o X na posição 5 é H ou está ausente, o X na posição 6 é H ou está ausente, o X na posição 7 é H ou está ausente, o X na posição 8 é H ou está ausente, o X na posição 9 é H ou está ausente, o X na posição 10 é H ou está ausente, o X na posição 11 é S ou está ausente, o X na posição 12 é S ou está ausente, o X na posição 13 é G ou está ausente, o X na posição 14 é L ou está ausente, o X na posição 15 é V ou está ausente, o X na posição 16 é P ou está ausente, o X na posição 17 é R ou está ausente, o X na posição 18 é G ou está ausente, o X na posição 19 é S ou está ausente, o X na posição 20 é H ou está ausente, o X na posição 21 é M ou está ausente, o X na posição 22 é A ou está ausente, o X na posição 23 é S ou está ausente, o X na posição 24 é M ou está ausente, o X na posição 25 é T ou está ausente, o X na posição 26 é G ou está ausente, o X na posição 27 é G ou está ausente, o X na posição 28 é Q ou está ausente, o X na posição 29 é Q ou está ausente, o X na posição 30 é M ou está ausente, o X na posição 31 é G ou está ausente, o X na posição 32 é R ou está ausente, o X na posição 33 é G ou está ausente, o X na posição 34 é S ou está ausente, o X na posição 35 é E ou está ausente, o X na posição 36 é F ou está ausente, o X na posição 37 é E ou está ausente e o X na posição 38 é L ou está ausente. Além disso, pelo fato de o S na posição 251 na SEQ ID NO:3 ter sido artificialmente substituído durante o processo de clonagem descrito na seção de exemplo neste relatório descritivo naquela sequência (a proteína ASP5 de *Ancylostoma* do tipo selvagem inclui um resíduo C nesta posição), é contemplado que o X na posição 251 da SEQ ID NO:4

possa ser S ou C.

[00050] Os polipeptídeos da presente invenção são capazes de induzirem uma resposta imune em um animal hospedeiro que seja exposto a estes polipeptídeos para produção de um ou mais dos anticorpos da presente invenção. Independentemente da técnica pela qual são derivados, os polipeptídeos da presente invenção são preparados, de preferência, em forma substancialmente pura quando o seu uso for destinado à criação de anticorpo. De preferência, estes polipeptídeos são pelo menos aproximadamente 80% puros, mais preferivelmente são pelo menos aproximadamente 90-95% puros, e ainda mais preferivelmente são pelo menos aproximadamente 99% puros. Técnicas exemplares para induzir resposta imune em organismo hospedeiro e para isolar anticorpos destes estão descritas neste relatório, porém deverá ser entendido que a presente invenção não está limitada àquelas técnicas. O técnico versado no assunto reconhecerá que existe uma pluralidade de técnicas para se atingir esse mesmo objetivo sem se desviar do escopo e do espírito da invenção.

II. Anticorpos da invenção

[00051] A presente invenção inclui ainda anticorpos e seus fragmentos de ligação a antígenos que são criados contra e se ligam especificamente a todos ou parte de um ou mais polipeptídeos da presente invenção, além de incluir também composições que compreendem os referidos anticorpos seus fragmentos de ligação a antígenos. Quando postos em contato com uma amostra obtida de um mamífero, estes anticorpos e fragmentos de ligação a antígenos são capazes de se ligarem especificamente ao antígeno de ancilostomídeo presente na amostra, porém não são capazes de se ligarem especificamente a qualquer outro antígeno de verme cilíndrico, verme-chicote ou verme do coração que possa estar presente na amostra. Os anticorpos da presente invenção são adequados para uso somente para

capturas um ou mais antígenos de ancilostomídeo, somente para detectar um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou, mais preferivelmente, para capturar e para detectar um ou mais antígenos de ancilostomídeo. O antígeno de ancilostomídeo que é capturado e/ou detectado pode ser, entre outros, CoproASP5.

[00052] Os anticorpos da presente invenção podem pertencer a qualquer classe de anticorpo, incluindo, por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e podem ser preparados por qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas pelo técnico versado no assunto (Consultar, 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); e *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, Howard and Kaser, eds., CRC Press (2006), cada um destes aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente).

[00053] Em uma técnica, o polipeptídeo da invenção é introduzido em um animal hospedeiro, tal como em coelho, camundongo, rato, cobaia, cabra, porco, vaca, ovelha, burro, cachorro, gato, galinha ou cavalo, por exemplo. Uma resposta imune intensificada pode ser induzida no animal hospedeiro associando o polipeptídeo a um veículo e/ou expondo o hospedeiro a um adjuvante, porém deverá ser entendido que a presente invenção não requer o polipeptídeo seja associado a um veículo ou que o hospedeiro seja exposto ao adjuvante. Um veículo de exemplo que pode ser utilizado para essa finalidade é albumina sérica bovina, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Adjuvantes exemplares incluem adjuvante completo ou incompleto de Freund e

adjuvante MDL-TDM. Independentemente de o polipeptídeo estar associado a tal veículo ou de o hospedeiro ser exposto a um adjuvante, imunizações de reforço podem opcionalmente ser feitas com o animal hospedeiro a ser sangrado uma ou mais vezes posteriormente. Anticorpos policlonais que se ligam especificamente ao polipeptídeo podem então ser purificados do antissoro obtido da sangria ou sangrias. Essa purificação pode ser alcançada, por exemplo, empregando técnicas de cromatografia por afinidade as quais envolvam associar o polipeptídeo a um suporte sólido. Estas técnicas de cromatografia por afinidade são bem-conhecidas daquele versado no estado da técnica.

[00054] Em uma concretização, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo criado em coelho, imunizando aquele animal hospedeiro com o polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO.:4. (A seguir, este anticorpo específico é denominado "anti-ASP5-1 pAB"). Uma técnica específica para produzir e isolar este anticorpo está descrita na seção de exemplos inclusa, porém o técnico versado no assunto reconhecerá que a produção e o isolamento de anti-ASP5-1 pAB, ou de qualquer outro anticorpo da presente invenção, não se limita àquela técnica específica.

[00055] Em outras concretizações, o anticorpo da presente invenção é criado em um hospedeiro contra um ou mais polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos que seja uma variante conservadora da sequência correspondente a SEQ ID NO.:3. Em algumas outras concretizações, o anticorpo da presente invenção é criado em um hospedeiro contra qualquer um ou mais polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos correspondente à sequência de SEQ ID NO.:4, ou um ou mais polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos que seja uma variante conservadora de qualquer uma desta sequência.

[00056] Deverá ser entendido também que os anticorpos da invenção podem ser opcionalmente anticorpos policlonais, anticorpos

monoclonais, anticorpos de cadeia única (scFv), anticorpos quiméricos, e fragmentos dos mesmos. Anticorpos monoclonais que são específicos para o polipeptídeo de interesse, tais como aquele com sequência idêntica ou homóloga a SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4, por exemplo, podem ser obtidos e purificados, por exemplo, preparando linhagens celulares que geram anticorpos com a especificidade desejada pelo polipeptídeo de interesse. Linhagens celulares desse tipo podem ser derivadas a partir de células de um determinado tipo (por exemplo, células de baço) que são isoladas de um animal hospedeiro que tenha sido previamente imunizado com o polipeptídeo como descrito antes. Em tal caso, estas células poderiam, então, ser imortalizadas, por exemplo, por sua fusão com células de mieloma por meio de uma de uma variedade de técnicas de fusão conhecidas do técnico versado no assunto. Em uma técnica exemplar, as células do animal hospedeiro imunizado são coincubadas com a sua parceira de fusão, por exemplo, as células de mieloma, na presença de um detergente por curto período de tempo antes de serem semeadas sobre um meio que sustente o crescimento de células híbridas (porém não da parceira de fusão de mieloma). Essa seleção pode ser alcançada, por exemplo, usando hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Quando células híbridas emergirem durante a seleção, talvez em uma ou duas semanas após ter-se iniciado o processo de seleção, colônias de um único híbrido (e seus sobrenadantes) são testadas quanto à capacidade com que se ligam ao polipeptídeo ou polipeptídeos contra o animal hospedeiro que foi imunizado. Colônias híbridas com a especificidade de ligação mais ideal representariam as melhores candidatas a partir das quais anticorpos monoclonais podem ser isolados. Estes anticorpos monoclonais podem, por exemplo, ser isolados diretamente a partir do sobrenadante (ou seja, meio) no qual estas colônias são cultivadas empregando qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas

do técnico versado no assunto.

[00057] O anticorpo da invenção pode ser também um anticorpo de cadeia única (scFv), ou um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo. Fragmentos de ligação a antígenos de anticorpos representam uma porção de um anticorpo intato compreendendo o sítio de ligação a antígeno ou uma região variável de um anticorpo intato, em que a porção não contém os domínios constantes da cadeia pesada da região Fc do anticorpo intato. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ e Fv. Além de produção e purificação a partir de células de animais ou de mamíferos, anticorpos, fragmentos de anticorpo ou arcabouços não pertencentes a anticorpos podem ser selecionados de acordo com várias tecnologias *in vitro*, incluindo exibição em fagos, visualização ribossomal ou exibição em bactérias.

[00058] Anticorpos, incluindo anticorpos secundários, podem ser marcados por qualquer tipo de marcação conhecida no estado da técnica, incluindo, por exemplo, marcações fluorescentes, quimioluminescentes, com enzimas, partículas colodais, radioisótopos e bioluminescentes. Em várias concretizações da invenção, o um ou mais dos anticorpos da invenção estão marcados com enzima, partícula coloidal ou fluoróforo. A partícula de marcação pode ser, por exemplo, partícula de látex colorida, corante coloidal ou ouro coloidal conjugado a um anticorpo.

III. Métodos, dispositivos e kits da invenção

A. Dispositivos e kits da invenção

[00059] A presente invenção, em uma modalidade, é um dispositivo para a detecção de infecção por ancilostomídeos em um mamífero, tal como canino, felino, suíno, bovino ou humano, por exemplo. O dispositivo é montado para ajudar na detecção da presença ou da ausência de antígeno de ancilostomídeo, tal como CoproASP5, por

exemplo, em uma amostra de um mamífero que pode estar infectado também com um ou mais outros vermes parasitas, incluindo verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração.

[00060] Em uma modalidade, o dispositivo inclui um suporte sólido, em que um ou mais anticorpos da invenção estão imobilizados sobre o suporte sólido. O suporte sólido pode ser, entre outros, a superfície interna, inferior de uma cavidade de uma placa de microtitulação ou um substrato que está incluído como parte de um dispositivo de fluxo lateral, por exemplo. Um exemplo de placa de microtitulação é representado por placa Immulon 1B de 96 poços (a qual é disponibilizada comercialmente pela Thermo Scientific de Milford, MA), porém, cabe ser entendido que o técnico versado no assunto reconhecerá que uma grande variedade de outras placas de microtitulação, diferentes da placa Immulon 1B de 96 poços, permite a imobilização de anticorpos nas mesmas e que, portanto, seriam adequadas como o suporte sólido da presente invenção.

[00061] Um dispositivo exemplar de fluxo lateral é o dispositivo de fluxo lateral descrito na Patente US Nº 5 726 010, a qual é aqui incorporada, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente. O dispositivo para execução de um ensaio de fluxo lateral por ser um dispositivo SNAP®, o qual é disponibilizado comercialmente pela IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME. Contudo, cabe ser entendido que o técnico versado no assunto reconhecerá que uma grande variedade de outros dispositivos de fluxo lateral, diferentes de dispositivos SNAP® ou dos descritos na Patente US Nº 5 726 010, permitem a imobilização de um anticorpo nos mesmo e cujo uso seria, portanto, adequado como o dispositivo da presente invenção. Estes dispositivos podem incluir, por exemplo, dispositivos de fluxo lateral que fazem uso da tecnologia de ouro coloidal.

[00062] Anticorpos utilizados no dispositivo da invenção podem ser

imobilizados no suporte sólido por qualquer metodologia conhecida no estado da arte, incluindo, por exemplo, união por ligação covalente ou não covalente, direta ou indireta dos anticorpos ao suporte sólido. Por conseguinte, embora estes anticorpos possam ser incorporados ao suporte sólido por adsorção física (ou seja, sem o uso de ligantes químicos), é também verdadeiro que estes anticorpos podem ser imobilizados ao suporte sólido por qualquer método de ligação química (ou seja, com o uso de ligantes químicos), reconhecido rapidamente por aquele versado no estado da técnica.

[00063] Deverá ser entendido também que o suporte sólido pode ser qualquer material adequado para a imobilização dos anticorpos da invenção. Por exemplo, o suporte sólido pode ser microesferas, partículas, tubos, cavidades, sondas, fitas reagentes, pontas de pipeta, lâminas, fibras, membranas, papéis, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses, vidro, polipropileno, polietileno, poliestireno, dextrano, náilon, amilases, plásticos, magnetita ou qualquer outro material adequado rapidamente reconhecido por aquele versado no estado da técnica.

[00064] O dispositivo pode incluir opcionalmente um ou mais reagentes marcados de captura de antígeno que podem ser misturados com uma amostra em teste antes que aplicados a um dispositivo da invenção. Quando incluído, o reagente marcado de captura de antígeno pode estar ou não depositado ou seco sobre uma superfície sólida do dispositivo. "Reagente de captura de antígeno" refere-se a qualquer composto que é específico para o antígeno ou antígenos de interesse. O reagente marcado de captura de antígeno, seja adicionado à amostra do mamífero ou tenha sido depositado previamente sobre o dispositivo, pode ser, por exemplo, um anticorpo marcado específico para um antígeno de ancilostomídeo, incluindo, entre outros, os anticorpos da presente invenção. Em apenas um único exemplo, anti-ASP5-1 pAB

conjugado com peroxidase de rábano silvestre pode ser utilizado como reagente marcado de captura de antígeno.

[00065] O dispositivo pode incluir também opcionalmente um reagente líquido que transporte (tal como quando o dispositivo é um dispositivo SNAP®, por exemplo) ou, de outra forma, facilite a retirada de (tal como quando o dispositivo inclui uma placa de microtitulação, por exemplo) material não ligado (por exemplo, partes não reagidas da amostra do mamífero, tal como, por exemplo, partes não reagidas de extrato fecal e reagente de captura de antígeno não reagido) da área de reação (fase sólida). O reagente líquido pode ser um reagente de lavagem e servir somente para retirada de material não ligado da área de reação, ou pode incluir um reagente detector e servir para retirar material não ligado e para facilitar a detecção do antígeno. Por exemplo, no caso de reagente de captura de antígeno conjugado a uma enzima, o reagente detector inclui um substrato que produz um sinal detectável quando da reação do conjugado enzima-anticorpo na área de reação (fase sólida). Alternativamente, no caso de reagente marcado de captura de antígeno conjugado a uma molécula radioativa, fluorescente ou absorvente de luz, o reagente líquido atua meramente como solução de lavagem, facilitando a detecção do complexo formado na área de reação ao lavar e retirar reagente marcado não ligado.

[00066] O reagente líquido pode incluir ainda uma quantidade limitada de um "inibidor", ou seja, uma substância que bloqueia o desenvolvimento do produto final detectável. Quantidade limitada é definida como a quantidade de inibidor suficiente para bloquear o desenvolvimento do produto final até que a maioria ou todo o excesso de material não ligado seja transportado e retirado da segunda região na qual um produto detectável com o tempo seja produzido.

[00067] O dispositivo da presente invenção pode incluir também vários reagentes de ligação, imobilizados em lugares distintos daquele

do reagente ou de reagentes de captura de antígeno. Por exemplo, um imunorreagente (anticorpo, antígeno ou polipeptídeo) que reconhece uma parte de uma parte do anticorpo específico para espécie (por exemplo, específica para ancilostomídeo) de um anticorpo ou reagente marcado de captura de antígeno, ou parte de uma enzima de um reagente marcado com enzima, pode ser incluído como controle positivo para avaliar a viabilidade dos reagentes dentro do dispositivo. Por exemplo, um controle positivo pode ser um anticorpo anti-peroxidase de rábano que foi criado em, por exemplo, cabra ou camundongo. Adicionalmente, um reagente, por exemplo, um anticorpo, isolado de um componente não imune da espécie a partir da qual a parte do anticorpo do complexo antígeno-anticorpo foi derivada, pode ser incluído como controle negativo para avaliar a especificidade de formação do imunocomplexo (ou seja, complexo antígeno-anticorpo).

[00068] Além de ser desenhado para detectar ancilostomídeo em uma amostra em teste, o dispositivo da invenção pode ser desenhado opcionalmente para permitir um ou mais outros testes diagnósticos serem realizados. Por exemplo, o suporte sólido pode incluir também reagentes para a detecção de um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas que não sejam vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias. Os reagentes para a detecção de um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas que não sejam 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 por anticorpos específicos para um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas que não sejam vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

[00069] Em uma concretização, o dispositivo da presente invenção é

uma placa de microtitulação que inclui uma pluralidade de poços, em que cada poço inclui um suporte sólido com anti-ASP5-1 pAB imobilizado no mesmo.

[00070] A placa pode ser utilizada em conjunto com um método da presente invenção para detectar ancilostomídeo em uma amostra em teste. Especificamente, uma infecção por ancilostomídeo pode ser diagnosticada em um mamífero por detecção de um ou mais antígenos de ancilostomídeo com o anti-ASP5-1 pAB que está imobilizado no suporte sólido. Em uma concretização, os antígenos que são detectados são coproantígenos de ancilostomídeo. "Coproantígenos de Ancilostomídeo" representam qualquer produto ou produtos de ancilostomídeo que estejam presentes em uma amostra fecal e que possam se ligar específica e estavelmente ao anti-ASP5-1 pAB. Coproantígenos de ancilostomídeo podem, portanto, ser ancilostomídeo inteiro, ovos de ancilostomídeo, fragmentos de ancilostomídeo ou produtos secretados, excretados ou eliminados por ancilostomídeos, ou uma combinação dos mesmos. Coproantígenos de ancilostomídeo incluem ainda os polipeptídeos da presente invenção, tais como os polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NOS:3 e 4, polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora destas sequências e/ou fragmentos antigênicos de qualquer um destes polipeptídeos, por exemplo. Um exemplo de coproantígeno de ancilostomídeo é o CoproASP5 que foi detectado pelos presentes inventores em amostras de material fecal obtido de caninos infectados por ancilostomídeos como descrito neste pedido de patente.

[00071] A invenção inclui ainda kits de ensaio (por exemplo, itens de manufatura) para detectar ancilostomídeo em uma amostra em teste. Um kit pode, portanto, incluir um ou mais dispositivos e/ou composições da presente invenção. Por exemplo, o kit pode incluir anticorpos anti-

ancilostomídeo e meios para determinar a ligação dos anticorpos a antígenos de ancilostomídeo na amostra. Em um exemplo específico, este kit inclui o dispositivo com um anticorpo anti-ancilostomídeo imobilizado, tal como anti-ASP5-1 pAB, por exemplo, um ou mais reagentes de captura de antígenos (por exemplo, um reagente marcado de captura de antígeno não imobilizado e um reagente de captura de antígeno imobilizado) e reagente de lavagem, bem como reagente detector e reagentes de controle positivo e negativo, se desejado ou apropriado. Outros componentes, tais como tampões, controles e os semelhantes, conhecidos de qualquer técnico versado no assunto, podem estar incluídos em tais kits de teste. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas, de modo a permitir concentrações em solução dos reagentes que otimizem substancialmente a sensibilidade do ensaio. Especificamente, os reagentes podem ser supridos em forma de pó seco, geralmente liofilizado, os quais quando dissolvidos fornecerão uma solução de reagentes com as concentrações apropriadas para se combinarem com uma amostra. Este kit pode incluir ainda instruções para execução de um ou mais métodos da presente invenção, incluindo instruções para o uso de qualquer dispositivo e/ou composição da presente invenção que esteja incluído no kit.

B. Métodos da invenção

[00072] A presente invenção inclui ainda métodos para usar um ou mais dos dispositivos, kits e/ou composições da presente invenção para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em uma amostra em teste. Os métodos, portanto, podem ser executados para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em uma amostra, como, por exemplo, amostra fecal, que é obtida de um mamífero, incluindo, entre outros, canino, felino, suíno, bovino ou ser humano. Além disso, os métodos podem ser conduzidos para detectar *Ancylostoma*, como

Ancylostoma caninum, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenal*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma tubaeforme* ou *Ancylostoma pluriidentatum*, por exemplo. Cabe entender, no entanto, que estes métodos não se limitam a serem utilizados para detectar *Ancylostoma*, e, por conseguinte, estes métodos podem ser conduzidos para fins de detectar outras espécies de ancilostomídeo, tais como *Necator* e/ou *Uncinaria*, incluindo *Necator americanus* e *Uncinaria stenocephala*, por exemplo. Estes métodos servem ainda para confirmar a presença ou ausência de ancilostomídeo em uma amostra, mesmo quando a amostra incluir um ou mais produtos derivados de outras espécies de verme, incluindo um ou mais produtos de verme cilíndrico, verme-chicote e/ou verme do coração.

[00073] Nos métodos da presente invenção, a detecção de ancilostomídeo pode ser conseguida detectando-se a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeo, tais como os polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NOS:1 e 2, bem como fragmentos antigênicos e/ou variantes conservadoras destas sequências, por exemplo. Quando a amostra sob teste para ancilostomídeo é de fezes, a parte solúvel das fezes pode ser coletada por qualquer protocolo conhecido na técnica. Por exemplo, além do protocolo específico descrito na seção de exemplos inclusa, as partes solúveis das amostras poderão ser em geral coletadas por filtração, extração, centrifugação ou simples mistura, seguido por deposição gravimétrica. O técnico versado no assunto reconhecerá que existe também uma variedade de maneiras para extrair e preparar amostras não fecais de um mamífero. Por exemplo, a amostra pode ser um líquido corporal que é naturalmente excretado ou de outra forma liberado pelo mamífero ou que seja artificialmente obtida do mamífero. Esta extração artificial pode ser conduzida ordenhando o mamífero ou injetando uma seringa no mamífero e retirando o líquido introduzido na

seringa. Uma vez obtido, o líquido pode ser opcionalmente fracionado (por exemplo, soro pode ser fracionado a partir de sangue total quando este for utilizado como a amostra). Como outro exemplo, a amostra pode ser obtida aplicando um esfregaço no mamífero, tal como à cavidade oral do mamífero. Como terceiro exemplo, a amostra pode ser obtida da mucosa do trato digestivo. A título de outro exemplo ainda, cortes de tecido podem ser obtidos por biopsia.

[00074] Os métodos incluem pôr a amostra em teste em contato com um ou mais anticorpos específicos para um ou mais antígenos de ancilostomídeo sob condições que permitam a formação de um complexo antígeno/anticorpo, ou seja, um imunocomplexo. Ou seja, um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno de ancilostomídeo presente na amostra. O técnico versado no assunto está familiarizado com ensaios e condições que podem ser utilizados para detectar tal ligação de complexo antígeno/anticorpo. Por exemplo, o complexo antígeno/anticorpo pode ser detectado usando um anticorpo secundário que se ligue ao complexo antígeno/anticorpo. A formação de um complexo entre antígeno de ancilostomídeo e anticorpos antiancilostomídeo na amostra pode ser detectada utilizando qualquer método adequado conhecido no estado da técnica.

[00075] Adicionalmente, a quantidade relativa de complexos anticorpo/antígeno que é formada em uma determinada reação pode ser medida com respeito àqueles formados em qualquer outra reação por qualquer metodologia conhecida no estado da técnica para se alcançar aquela meta. Quando é determinado que em uma amostra sob teste há mais complexos anticorpo-antígeno do que em uma amostra de controle, é possível concluir que existem ancilostomídeos na amostra testada. Quando este for o caso, pode ser concluído que o mamífero do qual a amostra testada foi obtida abriga uma infecção intestinal por ancilostomídeos. Qualquer uma ou ambas as conclusões de que o

ancilostomídeo está presente na amostra testada e de que o mamífero em teste abriga uma infecção intestinal por ancilostomídeo podem ser feitas por um prestador de serviços diagnósticos ou por quem prestar assistência ao mamífero, tal como o veterinário do mamífero, por exemplo. Quando determinar (ou for de outra forma informado a respeito) que um mamífero abriga uma infecção por ancilostomídeo, o responsável pelos cuidados poderá então submeter o mamífero a um ciclo de tratamento que é otimamente destinado a livrar o mamífero de infecção especificamente por ancilostomídeo, em vez de infecção parasitária por nematódeos em geral. Adicionalmente, seres humanos que possam entrar em contato com o animal infestado ou com suas excreções podem ser orientados a adotarem precauções contra adquirir o parasita. Nesse contexto, é importante determinar a espécie de verme com alta especificidade, uma vez que alguns helmintos, tais como ancilostomídeos e vermes cilíndricos, são capazes de causar doença significativa (por exemplo, *larva migrans*) em seres humanos, enquanto é em geral aceito que o verme-chicote não desempenha um papel zoonótico de relevância em seres humanos. Além disso, a presente invenção pode ser utilizada para confirmar se qualquer animal que recebeu tratamento para infecção por ancilostomídeos livrou-se daquela infecção.

[00076] As etapas do método da presente invenção podem incluir aplicar uma amostra em teste a um dispositivo da invenção, o qual inclui um anticorpo imobilizado específico para um ou mais antígenos de ancilostomídeo, e detectar a presença ou a ausência do antígeno de ancilostomídeo na amostra. Anticorpos específicos para antígenos de ancilostomídeos podem ser direta ou indiretamente anexados a um suporte sólido ou um substrato tal como uma cavidade de microtitulação, a parte de imobilização de anticorpo de um dispositivo SNAP®, microesfera magnética, microesfera não magnética, coluna,

matriz, membrana, rede fibrosa composta por fibras sintéticas ou naturais (por exemplo, vidro ou materiais à base de celulose ou polímeros termoplásticos, tais como, polietileno, polipropileno ou poliéster), estrutura sinterizada composta por materiais particulados (por exemplo, vidro ou vários polímeros termoplásticos) ou película moldada em membrana composta por nitrocelulose, náilon, polissulfona ou os similares (geralmente de natureza sintética). Todos estes materiais de substrato podem ser utilizados em formas adequadas, tais como películas, folhas ou placas, ou podem ser revestidos ou incorporados ou laminados em veículos inertes apropriados, tais como papel, vidro, películas plásticas ou tecidos. Métodos adequados para imobilizar peptídeos em fases sólidas incluem interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes e as similares.

[00077] Contudo, os métodos da presente invenção não requerem o uso de fases sólidas ou substratos. O técnico versado no assunto reconhecerá que existem algumas maneiras nas quais o presente método pode ser conduzido para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo sem envolver o uso de fases sólidas ou substratos. Em apenas um único exemplo, métodos de imunoprecipitação que não requerem o uso de fases sólidas ou substratos podem ser executados.

[00078] Em algumas concretizações da invenção, o complexo antígeno/anticorpo é detectado quando um reagente indicador, tal como conjugado enzimático que se liga ao anticorpo, catalisa uma reação detectável. Opcionalmente, um reagente indicador incluindo um composto gerador de sinal pode ser aplicado ao complexo antígeno/anticorpo sob condições que permitam a formação de um complexo antígeno/anticorpo/indicador detectável. Opcionalmente, o anticorpo pode ser marcado com um reagente indicador antes que o complexo antígeno/anticorpo seja formado.

[00079] A formação de um complexo antígeno/anticorpo ou um

complexo antígeno/anticorpo/indicador em alguns dos métodos da presente invenção pode ser especificamente detectada por métodos de radiometria, fluorimetria, fotometria, separação por tamanho ou de precipitação. A detecção de um complexo antígeno/anticorpo pode ser conseguida pela adição de um anticorpo secundário que está acoplado a um reagente indicador incluindo um composto gerador de sinal. Reagentes indicadores incluindo compostos gerados de sinal (marcadores) associados com um complexo polipeptídeo/anticorpo podem ser detectados usando os métodos descritos acima, e podem incluir agentes cromogênicos, catalisadores tais como conjugados enzimáticos, compostos fluorescentes, como fluoresceína e rodamina, compostos quimioluminescentes, como dioxetanos, acridínios, fenantridiníolos, rutênio e luminol, elementos radioativos, marcadores visuais diretos, bem como cofatores, inibidores, partículas magnéticas e similares. Exemplos de conjugados enzimáticos incluem fosfatase alcalina, peroxidase de rábano silvestre, beta-galactosidase e similares. A seleção de uma determinada marcação não é essencial, porém esta será capaz de produzir um sinal por si só ou em conjunto com uma ou mais substâncias adicionais.

[00080] Os métodos da invenção incluem, mas não se limitam àqueles à base de competição, reação direta ou ensaios do tipo sanduíche, incluindo, entre outros, pela técnica de *Western Blotting*, ELISA, RIA, ensaios imunofluorescentes (IFA), hemaglutinação (HA), imunoensaio de fluorescência por polarização (FPIA) e em ensaios em placa de microtitulação (ou seja, qualquer ensaio realizado em um ou mais poços de uma placa de microtitulação). Um ensaio da invenção inclui ensaio de ligação por cromatografia em fluxo reversível, o qual pode ser realizado, por exemplo, usando um dispositivo SNAP®. Consultar a Patente U.S. Nº 5 726 010.

[00081] Em algumas concretizações, o método da invenção facilita

ensaios de ligação específica tipo intercalada ou de competição. Em um ensaio intercalado, reagentes de captura de antígeno estão imobilizados em uma área reativa. Estes reagentes de captura de antígeno podem se ligar especificamente a antígenos na amostra em teste para ancilostomídeo. Após ligação do antígeno da amostra, o complexo reagente de captura de antígeno/antígeno é detectado por qualquer método adequado. Por exemplo, o complexo pode ser reagido com reagentes marcados de ligação específica (por exemplo, conjugado enzima-anticorpo) e o antígeno detectado (por exemplo, quando da reação com substrato).

[00082] Em outras concretizações do método da presente invenção, é realizado ensaio de competição. Em um ensaio de competição, reagentes de captura de antígeno estão imobilizados na área reativa e postos em contato simultaneamente com antígeno de uma amostra e antígeno marcado (por exemplo, conjugado antígeno-enzima). A quantidade de marcação detectada na área reativa é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra.

[00083] Em algumas concretizações do método, anticorpos específicos para um antígeno ou antígenos de ancilostomídeo são incorporados a uma fase sólida ou substrato. Uma amostra potencialmente incluindo um antígeno de ancilostomídeo é adicionada ao substrato. Anticorpos que se ligam especificamente ao ancilostomídeo são adicionados. Os anticorpos podem ser os mesmos anticorpos utilizados na fase sólida ou podem ser de origem ou espécie diferente. Além disso, estes anticorpos podem estar ligados a um reagente indicador, tal como um conjugado enzimático. Etapas de lavagem podem ser realizadas antes de cada adição. Um cromóforo ou substrato enzimático pode ser adicionado e pode ser permitido que cor se desenvolva. A reação de coloração pode ser interrompida e a cor pode ser quantificada usando, por exemplo, espectrofotômetro, e/ou a

cor pode ser avaliada subjetivamente por inspeção visual humana.

[00084] Em outras concretizações do método, anticorpos específicos para um antígeno ou antígenos de ancilostomídeo são incorporados a uma fase sólida ou substrato. Uma amostra potencialmente incluindo um antígeno de ancilostomídeo é adicionada ao substrato. Segundos anticorpos antiespécie que se ligam especificamente a antígenos de ancilostomídeos são adicionados. Estes segundos anticorpos são de uma espécie diferente daquela dos anticorpos na fase sólida. Terceiros anticorpos antiespécie 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 reagente indicador, tal como um conjugado enzimático. Etapas de lavagem podem ser realizadas antes de cada adição. Um cromóforo ou substrato enzimático pode ser adicionado e pode ser permitido que cor se desenvolva. A reação de coloração pode ser interrompida e a cor pode ser quantificada usando, por exemplo, espectrofotômetro, e/ou a cor pode ser avaliada subjetivamente por inspeção visual humana.

[00085] Em um exemplo específico, o método da presente invenção é realizado em conjunto com um dispositivo que é um dispositivo para ensaio de fluxo lateral, adicionando uma amostra preparada de extrato fecal mamífero a uma matriz de fluxo do dispositivo em uma primeira região (área de aplicação de amostra). A amostra preparada é conduzida em um trajeto de fluxo direto por ação capilar até uma segunda região da matriz de fluxo, onde existe um marcador particulado capaz de se ligar e formar um primeiro complexo com um antígeno na amostra. O marcador particulado pode ser, por exemplo, uma partícula de látex colorido, corante coloidal ou ouro coloidal conjugado a um anticorpo específico para um antígeno de ancilostomídeo. O primeiro complexo é transportado para uma terceira região da matriz de fluxo, onde um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno de

ancilostomídeo está imobilizado em um local distinto. Um segundo complexo é formado entre o anticorpo imobilizado e o primeiro complexo. O marcador particulado que faz parte do segundo complexo pode ser diretamente visualizado por inspeção visual humana.

[00086] O anticorpo contra ancilostomídeo pode ser um reagente de captura de antígeno imobilizado em uma área de reação (fase sólida). Um segundo reagente de captura de antígeno, ou seja, um segundo anticorpo contra ancilostomídeo que foi conjugado a um marcador, pode ser adicionado à amostra antes que a amostra seja adicionada ao dispositivo, ou o segundo reagente de captura de antígeno pode estar incorporado no dispositivo. Por exemplo, o reagente marcado de captura de antígeno pode ser depositado e seco sobre um trajeto de fluxo direto que permite a comunicação direta entre uma área de aplicação da amostra e a fase sólida. O contato do reagente marcado de captura de antígeno com a amostra em teste pode resultar em dissolução do reagente marcado de captura de antígeno.

[00087] Em uma concretização do método da presente invenção, antígeno de ancilostomídeo é detectado por ELISA. Exemplos específicos do método pela técnica ELISA da presente invenção estão descritos na seção de exemplos inclusa. Embora a presente invenção seja descrita com respeito àqueles métodos específicos por ELISA, deverá ser entendido, contudo, que qualquer técnico versado no assunto reconhecerá que etapas alternativas, adicionais ou substitutas de ELISA podem ser utilizadas sem se desviar do objetivo básico alcançado através deste método da invenção.

[00088] Em outra concretização da presente invenção, antígeno de ancilostomídeo é detectado utilizando um dispositivo de fluxo lateral, tal como dispositivo SNAP®, por exemplo.

[00089] Além disso, os métodos da invenção para detecção de infecção por ancilostomídeos podem ser combinados com outros

ensaios diagnósticos para detectar a presença de outros organismos ou condições. Por exemplo, ensaios da invenção podem ser combinados com reagentes que detectam um ou mais vermes parasitas fecais diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas fecais diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, um ou mais bactérias, um ou mais parasitas no sangue ou sangue oculto ou uma combinação dos mesmos. Ao prover dois ou mais sítios distintos de ligação em um único dispositivo de ensaio (tais como, por exemplo, dois locais distintos em um dispositivo de ensaio SNAP®), a presente invenção possibilita a detecção de dois ou mais organismos a partir de uma única amostra. Em uma concretização, existem três locais distintos para detecção de infecção ou infestação passada ou presente por três organismos (os locais sendo reagentes de ligação a antígeno ou anticorpo) a partir de uma única amostra (ou seja, a mesma amostra única é exposta aos três reagentes de captura em um único dispositivo). Em ainda outra concretização, existem quatro locais únicos para detecção de infecção ou infestação passada ou presente por quatro organismos (os locais sendo reagentes de ligação a antígeno ou anticorpo) a partir de uma única amostra (ou seja, a mesma amostra única é exposta aos quatro reagentes de captura em um único dispositivo). Deverá ser entendido, contudo, que o mesmo dispositivo pode incluir mais do que quatro locais distintos e/ou possibilitar a detecção de mais de quatro organismos.

[00090] Os reagentes para a detecção de um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas diferentes de 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 por anticorpos específicos para um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeos, um ou mais parasitas diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou uma ou mais bactérias.

[00091] Quando um dispositivo da presente invenção incluir reagentes para a detecção específica de verme cilíndrico e incluir reagentes para a detecção específica de verme-chicote, por exemplo, além de os reagentes para detectar ancilostomídeo, o método da presente invenção pode envolver usar aquele dispositivo para a finalidade ou finalidades adicionais de determinar se a amostra que está sendo testada para ancilostomídeo inclui também verme cilíndrico e/ou verme-chicote. Consultar o Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de série 61/122 260, intitulado "*Methods, Devices, Kits and Compositions for Detecting Roundworm, Whipworm, and Hookworm*", depositado em 12 de dezembro de 2008, o qual é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente. Neste arranjo, portanto, o método/dispositivo da presente invenção seria não só capaz de confirmar especificamente que ancilostomídeo está presente ou ausente a partir de qualquer amostra em teste em particular, porém seria útil também para confirmar especificamente que a amostra inclui ou não inclui qualquer antígeno de verme cilíndrico e/ou qualquer antígeno de verme-chicote. A capacidade de detectar especificamente ancilostomídeo e um ou mais outros organismos aplicando uma única amostra ao dispositivo da invenção seria útil para o prestador de cuidados ao animal do qual a amostra sob teste foi obtida. Um prestador de cuidados que é informado de que uma amostra inclui ancilostomídeo e verme-chicote, porém não verme cilíndrico, por exemplo, poderia usar esse conhecimento para tratar o mamífero do qual a amostra foi coletada especificamente para verme cilíndrico, administrando ao mamífero um fármaco com efeito ideal contra ancilostomídeo e um segundo fármaco com efeito ideal contra verme-chicote. Na ausência deste conhecimento, o prestador de cuidados pode de outra forma, por exemplo, tratar o mamífero com um fármaco com efeito ideal contra somente ancilostomídeo, somente verme-chicote ou nem contra

ancilostomídeo, nem contra verme-chicote (em tais casos, o mamífero estaria em risco de receber tratamento abaixo do ideal). Adicionalmente, seres humanos que possam entrar em contato com o animal infestado ou suas excreções podem ser orientados a adotar precauções contra adquirir o parasita ou os parasitas. Nesse contexto, é importante determinar a espécie de verme com alta especificidade, uma vez que helmintos, tais como ancilostomídeos e vermes cilíndricos, são capazes de causar doença significativa (ou seja, *larva migrans*) em seres humanos, enquanto é em geral aceito que o verme-chicote não desempenha um papel zoonótico de relevância em seres humanos.

[00092] O método pode incluir ainda opcionalmente o uso de um ou mais ácidos nucleicos de ancilostomídeo para ajudar a confirmar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em uma amostra testada. Estes ácidos nucleicos para determinar a presença de ancilostomídeo podem ser utilizados antes, após ou concomitantemente com quaisquer outras modalidades do método, incluindo a detecção de ancilostomídeo por anticorpo. Por conseguinte, em uma modalidade, depois que ancilostomídeo é detectado ou não em uma determinada amostra e o mamífero do qual a amostra foi obtida é diagnosticado como tendo ou não infecção por ancilostomídeo, a amostra (ou uma amostra obtida mais tarde do mamífero diagnosticado) pode ser testada quanto à presença ou a ausência de qualquer um ou ácidos nucleicos específicos de ancilostomídeo. Caso não se conseguisse detectar ancilostomídeo em um determinado mamífero usando um ou mais ácidos nucleicos (após o ancilostomídeo ter sido detectado usando um ou mais anticorpos), seria necessário levar em consideração a possibilidade de que os anticorpos teriam detectado antígeno de ancilostomídeo antes que o aparecimento de ácido nucleico de ancilostomídeo pudesse ser detectado na amostra. Em tal situação, o prestador de cuidados ao mamífero pode optar por ignorar a observação

de que o ácido nucleico não conseguiu detectar o ancilostomídeo e prosseguir tratando o mamífero especificamente para infecção por ancilostomídeo com base na observação de que os anticorpos detectaram de fato ancilostomídeo.

[00093] Em outra modalidade, ácidos nucleicos são utilizados para determinar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em um mamífero em particular e, depois, a presença ou a ausência de ancilostomídeo é ainda avaliada usando os anticorpos da presente invenção. A detecção de um ou mais ácidos nucleicos de ancilostomídeo pode ser conduzida usando quaisquer técnicas de detecção de ácido nucleico conhecidas pelo técnico versado no assunto. Por exemplo, esta detecção pode ser conduzida utilizando uma técnica à base de PCR, tal como, entre outras, por exemplo, uma técnica baseada em PCR em tempo real. Técnicas exemplares à base de PCR estão descritas em, *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 2ª edição, Bartlett and Stirling, eds., Humana Press (2003); e Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); cada uma destes aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

[00094] A presente invenção é especificamente descrita com referência a certos exemplos; no entanto, esta não deverá ser interpretada como estando limitada aos mesmos.

EXEMPLO 1

[00095] Uma nova isoforma de ASP5, denominada neste pedido de patente CoproASP5, está presente em fezes de caninos que estão infectados com *Ancylostoma*.

[00096] Preparo de amostra fecal canina. Animais caninos conhecidos por abrigarem uma infecção por ancilostomídeo (*Ancylostoma caninum*) ou por não apresentarem infecção por verme parasitário constituíram a fonte de amostras fecais. Uma amostra

(aproximadamente 1 grama) de fezes caninas congeladas sem conservante, recolhida de cinco caninos infectados ou não por ancilostomídeo, foi suspensa em 4 ml de tampão de extração ("tampão de extração" é formado por 1X solução salina com tampão fosfato (PBS), pH 7,0 – 7,5 com Tween-20 0,05%). Esta suspensão foi agitada em vórtice por 2 minutos e, em seguida, centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos para produzir um primeiro sobrenadante. Este primeiro sobrenadante foi então centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos para produzir um segundo sobrenadante. Este segundo sobrenadante é denominado a seguir "extrato fecal".

[00097] Cromatografia por troca iônica. Cromatografia por troca iônica foi realizada usando Colunas HiTrap® Sepharose® HP IEX, disponibilizadas comercialmente pela GE Helathcare Bio-Sciences Corp. de Piscataway, NJ, de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, o extrato fecal foi ajustado para pH 5,0 – 5,5 com HCl e, em seguida, escoado sobre a coluna HiTrap SP HP em vazão de 2 mL/ min. A coluna foi lavada com tampão de ácido acético, pH 5,0 – 5,5. Foi feita a eluição da coluna com tampão de ácido acético, pH 5,0 – 5,5 + NaCl 1 M. O eluído foi então concentrado com concentrador Icon, Thermo Scientific, Cat. ref. 89887.

[00098] Em seguida, foi realizada espectroscopia de massa sobre o eluído da cromatografia de troca iônica (figura 1) com espectrômetro Waters Q-T of Ultima Mass (Espectrometria de massa com recurso do Yale Cancer Center e laboratório com recurso da fundação W. M. Keck foundation Biotechnology, New Haven, Connecticut). Essa análise identificou quatro fragmentos polipeptídicos, os quais identificaram positivamente a banda N-terminal de 28kD (CoproASP5) como fragmento de ASP5.

[00099] Análise por Western Blotting. A análise por Western Blotting foi realizada de acordo com protocolos bem-conhecidos pelo técnico

versado no assunto. Resumidamente, uma mistura da amostra de 18 µl (em cada faixa 1-X) foi separada por peso molecular em gel de SDS-PAGE com gradiente de 4 - 16% e transferida para uma membrana de nitrocelulose (figura 1). Cada mistura de amostra continha 5 µl de tampão de Amostra 4X NuPAGE LDS, adquirido da Invitrogen (Cat. ref. NP0007) e 2 µl de agente redutor de Amostra NuPAGE, adquirido da Invitrogen (Cat. ref. NP0004). A faixa 1 continha ainda 13 µl de extrato de ancilostomídeo inteiro (*Ancylostoma caninum*, adquirido da Antibody Systems, Inc. Hurst, TX (Cat. ref. 76054); a faixa 2 continha ainda 13 µl de "fração 32" obtida dos caninos infectados com ancilostomídeo no experimento de cromatografia por troca iônica; a faixa 3 continha ainda 13 µl de "fração 33" obtida dos caninos infectados com ancilostomídeo no experimento de cromatografia por troca iônica; a faixa 4 continha ainda 13 µl de uma primeira fração obtida de caninos não infectados no experimento de cromatografia por troca iônica; a faixa 5 continha ainda 13 µl de uma segunda fração obtida de caninos não infectados no experimento de cromatografia por troca iônica; a faixa 6 continha 13 µl de extrato fecal (não fracionado) obtido dos caninos infectados com ancilostomídeo; e a faixa 7 continha 13 µl de extrato fecal (não fracionado) obtido dos caninos não infectados. (Padrões moleculares foram testados na faixa marcada com "M". Os tamanhos destes padrões moleculares estão indicados).

[000100] Após transferência de proteína para a membrana, a membrana foi sondada utilizando anti-Ac-ASP-5 pAB ("Anti-Ac-ASP-5 pAB" foi criado contra ASP5 e isolado como descrito no Pedido de Patente U.S. Nº 11/763 583, intitulado "*Roundworm Cropoantigen Detection*", depositado em 15/06/2007, atribuído a IDEXX Laboratories e aqui incorporado, em sua totalidade por referência neste pedido de patente). O anticorpo de detecção foi o anti-Ac-ASP-5pAB conjugado à peroxidase de rábano (HRPO). O conjugado foi feito marcando IgG pAb

reduzida com SMCC-HRPO (SMCC representa 4-[N-maleimidometil]ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidila).

[000101] Como mostrado na figura 2, anti-Ac-ASP-5 pAB ligou-se a um produto de aproximadamente 56 kDa no extrato de ancilostomídeo inteiro (faixa 1; consultar ponta de flecha). Além disso, como mostrado pelas setas escuras, anti-Ac-ASP-5 pAB hibridizou-se com um produto de aproximadamente 28 kDa nas duas faixas contendo as amostras fecais de caninos infectados com ancilostomídeo que foram fracionadas por cromatografia por troca iônica (ou seja, faixas 2 e 3), e na amostra fecal não fracionada de caninos infectados com ancilostomídeo (faixa 7; consultar a flecha tracejada). Esses dados indicam que uma versão truncada de ASP-5 (de aproximadamente 28 kDa, neste relatório descritivo denominada CoproASP5) está presente em caninos infectados com ancilostomídeo e não está presente em caninos não infectados.

EXEMPLO 2

[000102] Anticorpo criado contra a SEQ ID NO:4 liga-se especificamente a coproantígeno em caninos infectados com ancilostomídeo, porém não se liga especificamente a qualquer coproantígeno em caninos infectados com verme cilíndrico ou verme-chicote.

[000103] Preparo e isolamento de anticorpo policlonal Um anticorpo policlonal anti-ASP5-1 foi criado em coelho contra um polipeptídeo contendo sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO:4 (ou seja, ASP5-1) e purificado do soro por métodos-padrão.

[000104] Resumidamente, nucleotídeos da posição 50 a 427 da SEQ ID NO:2 foram clonados nas posições corretas de leitura em um vetor (D8223, o qual é derivado de pUC19) para criar o plasmídeo D8339. Especificamente, os 129 aminoácidos da SEQ ID NO:4 que seguem o resíduo metionina no N-terminal daquela sequência correspondem a

uma parte da SEQ ID NO:3 e são codificados pela parte clonada da SEQ ID NO:2. No plasmídeo D8339, o resíduo metionina no N-terminal foi codificado por sequência do vetor na junção daquele plasmídeo onde o vetor foi ligado à sequência clonada de SEQ ID NO:2.

[000105] A sequência de DNA codificadora de SEQ ID NO:2 foi então clivada do plasmídeo TDX184 por digestão pela enzima de restrição exonuclease (NdeI e BamHI) e purificada. Esta sequência purificada foi então ligada a um vetor de expressão linearizado, pET28a, e o construto circular resultante (pTDX204::DIV6716) foi transformado em células BL21 (DE3) de *E. coli* (A sequência completa do inserto foi confirmada por análise de sequências de DNA). A expressão de proteína de fusão *His-tagged* foi induzida por adição de IPTG 1 mM a culturas do *E. coli* transformado. A proteína recombinante foi solubilizada em ureia 6 M e purificada por cromatografia por troca e iônica e afinidade por níquel (Esta proteína recombinante é a seguir denominada "ASP5-1").

[000106] Depois que a proteína ASP5-1 foi introduzida em coelhos, anti-ASP5-1 pAB foi purificado do plasma dos coelhos imunizados por isolamento de anticorpo IgG por cromatografia de afinidade por proteína G.

[000107] Preparo de extrato fecal canino. Animais caninos conhecidos por estarem livres de infecção parasitária por vermes ou infectados com um de qualquer ancilostomídeo (*Ancylostoma caninum*, *Uncinaria*), verme cilíndrico (*Toxocara canis*), verme-chicote (*Trichuris vulpis*) ou verme do coração (*Dirofilaria immitis*) constituíram a fonte de amostras fecais. Extrato fecal foi gerado a partir destas amostras caninas como descrito acima.

[000108] Ensaio por ELISA. Anti-ASP5-1 pAB purificado (3 µg/ml em cada cavidade) foi imobilizado por adsorção física em placas Immulon 1B de 96 poços durante a noite a 4 °C. As placas foram então bloqueadas com BSA 1% em Tris 0,1M, pH 7,0, a 4 °C durante a noite,

seguido por secagem à temperatura ambiente. Aproximadamente 100 µl de extrato fecal foram adicionados a cada poço e deixados que incubassem em temperatura ambiente por uma hora. Os poços foram então lavados cinco vezes com solução de PBS-Tween-20, de acordo com métodos-padrão conhecido daqueles versados no estado da técnica. Em um recipiente de reação separado, anti-ASP5-1 pAB livre foi marcado com peroxidase de rábano (HRP), usando o reticulante 4-[N-maleimidometil]ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC) para criar um conjugado, e 10 µg/ml deste conjugado foram adicionados a cada cavidade contendo anti-DIV6716 pAB imobilizado. Após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, conjugado não ligado foi lavado dos poços com solução de PBS-Tween-20, de acordo com métodos-padrão conhecidos daqueles versados no estado da técnica. 50 µl de substrato de peroxidase TMBLUE® (SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA) foram então adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após interromper cada reação enzimática com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS), depois do período de incubação de 10 minutos, o valor da densidade óptica (OD) de cada poço da placa de 96 poços foi medido a A650 por técnicas-padrão de espectrofotometria, usando um leitor de placa ELISA, para gerar um "valor de OD650" (ou, mais simplesmente, "valor de OD") para cada poço. Nesse arranjo, o valor de OD obtido para qualquer poço em particular da placa de 96 poços foi diretamente proporcional à quantidade de antígeno especificamente ligado presente no poço.

[000109] O exemplo 2 teve como meta determinar se o anticorpo policlonal anti-ASP5-1 liga-se especificamente a ancilostomídeo em extrato fecal. Determinações isoladas de OD para amostras fecais caninas agrupadas, obtidas no exemplo 1, são apresentadas na figura 2. Estas amostras fecais foram obtidas de 5 animais caninos conhecidos

por estarem livres de infecção por verme parasitário ("não infectado"), 5 animais caninos conhecidos por estarem infectados com ancilostomídeo ("infectado por ancilostomídeo"), 5 animais caninos conhecidos por estarem infectados com verme cilíndrico ("infectado por verme cilíndrico") e 5 animais caninos conhecidos por estarem infectados com verme-chicote ("infectado por verme-chicote"). (Especificamente, amostras fecais foram obtidas no 7º dia após a infecção de cada um dos cinco caninos infectados por verme parasitário).

[000110] A OD foi também determinada para uma amostra que incluía 100 µl de PBS em vez de extrato fecal. Esta amostra de PBS e a amostra de "não infectado" descrita acima serviram como controles negativos. Além disso, a OD foi determinada também para uma amostra que continha proteína ASP5-1 (SEQ ID NO:4) (adicionada à placa a 1 µg/ml), que serviu como controle positivo.

[000111] Como mostrado na figura 3, o valor de OD medido de cada um dos controles negativos de não infectado e do PBS foi de 0,05. Por outro lado, a OD medida da amostra fecal infectada com ancilostomídeo foi de 0,99, valor aproximadamente 20 vezes mais alto do que os valores de OD medidos para amostras de controle negativo. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB liga-se especificamente a coproantígeno em animais caninos infectados por ancilostomídeo, porém não se liga especificamente a qualquer coproantígeno em animais caninos não infectados. Estes dados indicam, portanto, que anti-ASP5-1 pode ser utilizado para detectar a presença ou a ausência de infecção por ancilostomídeo em animal canino.

[000112] Adicionalmente, o valor de OD medido de cada um dos controles negativos de infectado por verme cilíndrico e de infectado por verme-chicote foi de 0,06, o qual se aproximou do valor de OD medido dos controles negativos. Esses dados indicam que anti-ASP5-1

pAB não se liga especificamente a qualquer coproantígeno de verme cilíndrico ou de verme-chicote.

EXEMPLO 3

[000113] Anti-ASP5-1 pAB detecta coproantígeno de ancilostomídeo em alguns caninos já em 9 dias após terem se infectado com ancilostomídeo. Anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeo em fezes de animais caninos que sofreram infecção por ancilostomídeo, porém que se livraram do verme.

[000114] O exemplo 3 teve como meta determinar se anti-ASP5 pAB é capaz de detectar coproantígeno de ancilostomídeo em caninos infectados por ancilostomídeo antes que ovos de ancilostomídeo apareceram pela primeira vez nas fezes destes caninos. O exemplo 3 teve ainda como meta determinar se anti-ASP5 pAB detecta ancilostomídeo em fezes de animais caninos que se livraram de uma infecção prévia por ancilostomídeos.

[000115] Para atingir estas metas, valores de OD foram medidos para amostras fecais obtidas de um primeiro conjunto de cinco caninos, e são apresentados na figura 4. Estes caninos, identificados como "RKY", "SKZ", "OGY", "LEY" e "SKZ", foram infectados com ancilostomídeo no dia 0 e foram tratados com o agente anti-helmíntico Interceptor® no dia 91 após administração da infecção como descrito acima. Amostras fecais foram coletadas de todos ou de alguns destes caninos no dia 0, no dia 2 e no dia 111 após a administração das infecções por vermes cilíndricos a estes animais, e em dias selecionados entre o dia 2 e o dia 111. A observação microscópica das amostras fecais do primeiro conjunto de caninos confirmou que cada uma das amostras coletada no dia 0 ao dia 13 e no dia 97 ao dia 111 estava substancialmente livre de ovos de ancilostomídeo, e que estes ovos estavam presentes somente nas amostras em cada uma do dia 17 ao dia 93.

[000116] Valores de OD, apresentados na figura 4, foram medidos

também para um segundo conjunto de caninos, identificados como "LCZ", "SBY", "RCZ", "SVY" e "TIY", que nunca haviam sido infectados com ancilostomídeo (e, portanto, serviram como controles negativos). Amostras fecais foram coletadas de cada um destes caninos no dia em que o primeiro conjunto de caninos foi infectado com ancilostomídeo (dia 0). Além disso, amostras fecais foram coletadas deste segundo conjunto de caninos no dia 2 e no dia 107 após a administração das infecções de verme cilíndrico ao primeiro conjunto de caninos, e em dias selecionados entre o dia 1 e o dia 107. A observação microscópica das amostras fecais do segundo conjunto de caninos confirmou que cada uma das amostras coletadas no dia 0 ao dia 107 estava livre de ovos de verme cilíndrico.

[000117] Com referência à figura 4, o valor médio de OD medido para o primeiro conjunto de cinco caninos, no dia 9, foi de 0,84, valor vinte vezes mais alto do que a média dos valores de OD (0,04) que foram medidos para estes caninos no dia 0, e foi aproximadamente 17 vezes mais alta do que a média dos valores de OD (0,05) que foram medidos para o segundo conjunto de caninos (ou seja, os caninos de controle negativo) no dia 0 ao dia 107. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB é útil para detectar ancilostomídeo em fezes de canino infectado por ancilostomídeo já em 9 dias após o canino ter se infectado inicialmente com ancilostomídeo.

Tabela 1:

Identificação do canino	Dia																					
	0	2	9	13	17	21	23	31	38	48	52	62	69	76	84	87	93	97	100	105	107	111
RKY	0,04	0,05	0,29	2,28	2,23	2,40	2,63	2,68	2,65	2,62	2,53	2,58	2,70	2,48	2,57	2,49						
	0,00	0,00	0,03	0,17	0,19	0,27	0,07	0,05	0,22	0,14	0,18	0,23	0,14	0,03	0,08	0,07						
SKZ	0,04	0,04	0,49	2,25	2,45	2,38	2,37	2,43	2,78	2,62	2,58	2,53	2,55	2,64	2,48	2,62						
	0,00	0,00	0,04	0,05	0,04	0,15	0,05	0,06	0,01	0,09	0,01	0,01	0,07	0,12	0,01	0,03						
OGY	0,04	0,04	1,00	1,87	2,71	2,53	2,62	2,82	2,78	2,76	2,85	2,76	2,78	2,73	2,72	2,67	1,87	0,04	0,04	0,20	0,33	1,73
	0,00	0,00	0,02	0,05	0,03	0,07	0,00	0,02	0,01	0,01	0,05	0,04	0,01	0,03	0,12	0,02	0,09	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06
LEY	0,04	0,04	0,44	2,12	2,45	2,78	1,99	2,67	2,61	2,65	2,77	2,55	1,43	2,65	2,69	2,53	0,23	0,05	0,10	0,44	0,36	1,52
	0,00	0,00	0,00	0,04	0,05	0,06	0,10	0,06	0,03	0,05	0,06	0,05	0,02	0,05	0,09	0,19	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02
SXZ	0,05	0,04	2,00	2,85	2,64	2,57	2,67	2,75	2,68	2,75	2,85	2,69	2,95	2,64	2,88	2,82	2,62	0,23	0,05	0,20	0,42	1,62
	0,00	0,00	0,02	0,06	0,17	0,08	0,04	0,19	0,08	0,23	0,07	0,19	0,02	0,07	0,02	0,00	0,15	0,04	0,00	0,04	0,02	0,03

[000118] A tabela 1 contém uma representação numérica dos dados apresentados na figura 4. Os valores de OD (em negrito) indicam a média de duas medições. O desvio-padrão é fornecido em fonte normal abaixo de cada valor médio de OD. Para os dias 93-111, não há dados para os caninos RKY e SKZ, por terem sido sacrificados para análise de necropsia.

[000119] Continuando com referência à figura 4, os valores de OD medidos para as amostras fecais coletadas do primeiro conjunto de cinco caninos no dia 38 ao dia 93 foram muitas vezes mais altos do que o foram os valores de OD medidos para amostras fecais daqueles mesmos caninos após serem tratados com o agente anti-helmíntico. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeo em fezes de canino que se livrou de uma infecção prévia por ancilostomídeo. Em amostras coletadas do primeiro conjunto de cinco caninos no dia 105 ao dia 111, os valores de OD aumentaram novamente. O anti-helmíntico utilizado, Interceptor®, é conhecido por não ser 100% eficaz em uma única dose. O sinal é reobtido à medida que os nematódeos se recuperam. Adicionalmente, interceptor pode não eliminar todos os estágios larvais; portanto, qualquer larva presente no paciente daria origem a novos vermes adultos.

EXEMPLO 4

[000120] Anti-ASP5-1 pAB detecta coproantígeno de ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala* em alguns caninos já em 15 dias após terem sido infectados com ancilostomídeo, e anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeo em fezes de animais caninos que já sofreram infecção por ancilostomídeos, porém que se livraram do verme.

[000121] O exemplo 4 teve como meta determinar se anti-ASP5-1 pAB é capaz de detectar coproantígeno de ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala* em caninos infectados por ancilostomídeo. O exemplo 4 teve também como meta determinar se anti-ASP5-1 pAB

detecta a espécie *Uncinaria stenocephala* de ancilostomídeos em fezes de animais caninos que se livraram de infecção prévia por ancilostomídeos.

[000122] Para atingir estas metas, valores de OD foram medidos para amostras fecais obtidas de um conjunto de quatro caninos e estão apresentados na figura 5. Estes caninos, identificados como "GCB8", "GUB8", "DLB8" e "EEB8", foram infectados com a espécie *Uncinaria stenocephala* de ancilostomídeos no dia 0 e foram tratados com o agente anti-helmíntico Interceptor® no dia 42 após a administração da infecção como descrito antes. Amostras fecais foram coletadas de todos ou de alguns destes caninos em dias selecionados entre o dia 7 e o dia 52 após a administração das infecções por ancilostomídeo a estes animais. A observação microscópica das amostras fecais dos caninos confirmou que ovos de ancilostomídeo eram detectados já no dia 8 (GUB8) ao dia 21 (EEB8), e que pelo dia 49, todas as amostras estavam livres de ovos pelo restante do estudo (tabela 2).

[000123] Com referência à figura 5, o valor médio de OD, medido para o conjunto de quatro caninos no dia 15, foi de 0,28, valor acima de 4,4 vezes mais alto do que a média dos valores de OD (0,06) que foram medidos para estes caninos no dia 7, e foi aproximadamente 6,5 vezes mais alto do que a média dos valores de OD (0,04) que foram medidos para um segundo conjunto de caninos (ou seja, os caninos de controle negativo, dados não mostrados) no dia 35 ao dia 124. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB é útil para detectar ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala* em fezes de canino infectado por ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala* já em 15 dias após o canino ter se tornado inicialmente infectado por ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala*.

Tabela 2. Dados de ovos por grama de fezes para cachorros infectados por *U. stenocephala* de PLRS

Identificação do canino	Dias após a infecção																					
	Dia	8	12	14	15	17	19	21	22	24	26	29	30	33	35	36	38	42	43	45	49	52
DLB8		0	0		0		6		57		121	174		407		215			419			
GUB8		13	3		4		0		2		7	3		15		6			27			
EEB8				0		0		14		46			27		54		402	65		0	0	0
GCB8				30		177		742		452			376		326		112	550		1	0	0

[000124] Continuando com referência à figura 5, os valores de OD medidos para as amostras fecais coletadas do conjunto de quatro caninos no dia 15 ao dia 42 foram muitas vezes mais altos do que o foram os valores de OD medidos para amostras fecais daqueles mesmos caninos após serem tratados com o agente anti-helmíntico. Os valores de OD retornaram ao antecedente pelo dia 45. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeo da espécie *Uncinaria stenocephala* em fezes de canino que se livrou de uma infecção prévia por ancilostomídeos.

EXEMPLO 5

[000125] Anti-ASP5-1 pAB detecta coproantígeno de ancilostomídeo de *Ancylostoma tubaeforme* em alguns felinos já em 14 dias após terem sido infectados com ancilostomídeo, e anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeo em fezes de animais felinos que sofreram infecção por ancilostomídeos, porém que se livraram do verme.

[000126] O exemplo 5 teve como meta determinar se anti-ASP5-1 pAB é capaz de detectar coproantígeno de ancilostomídeo de *Ancylostoma tubaeforme* em felinos infectados por ancilostomídeo antes que ovos de ancilostomídeo apareçam pela primeira vez nas fezes destes felinos. O exemplo 5 teve também como meta determinar se anti-ASP5-1 pAB detecta a espécie *Ancylostoma tubaeforme* de ancilostomídeos em fezes de animais felinos que se livraram de uma infecção prévia por ancilostomídeos.

[000127] Para atingir estas metas, valores de OD foram medidos para amostras fecais obtidas de um conjunto de quatro felinos e estão apresentados na figura 6. Estes felinos, identificados como "AAA3", "JAD1", "AQU5" e "AQU3", foram infectados com a espécie *Ancylostoma tubaeforme* de ancilostomídeos no dia 0 e foram tratados com o agente anti-helmíntico Interceptor® no dia 49 após a administração da infecção como descrito antes. Amostras fecais foram

coletadas de todos ou de alguns destes felinos no dia - 14, no dia +7 e no dia 73 após a administração das infecções de ancilostomídeos a estes animais, e em dias selecionados entre o dia +7 e o dia +59. A observação microscópica das amostras fecais dos felinos confirmou que cada uma das amostras coletadas no dia -14 no dia +17 e no dia +49 no dia +73 estava substancialmente livre de ovos de ancilostomídeo, e que estes ovos estavam presentes somente nas amostras em cada um do dia 21 ao dia 45 (tabela 3).

[000128] Com referência à figura 6, o valor médio de OD medido para o conjunto de quatro felinos no dia +14 foi de 0,15, valor acima de 3 vezes mais alto do que a média dos valores de OD (0,05) que foram medidos para estes felinos no dia 7, e aproximadamente 3 vezes mais alto do que a média dos valores OD (0,05) que foram medidos para o segundo conjunto de felinos (ou seja, os felinos de controle negativo; dados não mostrados) no dia +38 ao dia +105. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB é útil para detectar ancilostomídeo da espécie *Ancylostoma tubaeforme* em fezes de felino infectado por ancilostomídeo da espécie *Ancylostoma tubaeforme* já em 14 dias após o felino ter-se tornado inicialmente infectado com ancilostomídeo da espécie *Ancylostoma tubaeforme*.

Tabela 3. Dados de ovos por grama de fezes de felinos infectados por *A. tubaeforme* de PLRS

Identificação do felino	Dias após a infecção										
	+21	+28	+30	+35	+38	+42	+45	+49	+52	+57	+59
AAA3	39	242	1035	514	954	1028	210	0	0	0	0
AQU3	11	237	391	480	601	730	481				
JAD1	96	589	735	577	749	415	502	0	0	0	0
AQU5	0	0	5	192	92	791	239	175	321	194	77

[000129] Continuando com referência à figura 6, os valores médios de OD medidos para as amostras fecais coletadas do conjunto de quatro felinos nos dias +14 ao dia +45 foram muitas vezes mais altos do que os valores de OD medidos para amostras fecais destes mesmos animais após serem tratados com o agente anti-helmíntico. Esses dados indicam que anti-ASP5-1 pAB não detecta ancilostomídeos da espécie *Ancylostoma tubaeforme* em fezes de felino que se livrou de uma infecção prévia por ancilostomídeos. O anti-helmíntico utilizado, Interceptor®, é conhecido por não ser 100% eficaz com uma única dose. O sinal é reobtido à medida que os nematódeos se recuperam. Adicionalmente, interceptor pode não eliminar estágios larvais; por conseguinte, qualquer larva presente no paciente daria origem a novos vermes adultos.

[000130] A invenção descrita neste pedido de patente por meio de ilustrações pode ser adequadamente praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não são especificamente descritos neste relatório. Por conseguinte, por exemplo, em cada situação em que qualquer um dos termos "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em" podem ser substituídos por qualquer um dentre os outros termos, embora retendo seus significados habituais. Os termos e as expressões que foram empregados são utilizados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes dos atributos mostrados e descritos, ou de partes destes, porém é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do âmbito da invenção reivindicada. Portanto, deve ser entendido que, embora a presente invenção tenha sido especificamente descrita por concretizações preferidas e características opcionais, aqueles versados no estado da arte poderão recorrer à modificação e variação dos conceitos descritos neste pedido de patente, e que tais

modificações e variações são consideradas abrangidas pelo âmbito desta invenção como definida pela descrição e as reivindicações anexadas.

[000131] Alguns exemplos ajudam a ilustrar a invenção que foi descrita. Não obstante, será entendido que várias modificações podem ser efetuadas sem se afastar do espírito e do âmbito da invenção. Dessa forma, outras concretizações são abrangidas pelo âmbito das reivindicações anexadas ao presente pedido de patente.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeo em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) pôr a amostra em contato com um ou mais anticorpos que são capazes de se ligar especificamente ao polipeptídeo CoproASP5, que é um fragmento N-terminal de 28 kDa da proteína ASP5, em que o referido polipeptídeo é isolado da matéria fecal, e em que o referido polipeptídeo compreende quatro fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9); e

(b) detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou detectar a presença ou a ausência de um ou mais complexos antígeno de ancilostomídeo-anticorpo.

2. Método para diagnosticar uma infecção intestinal por ancilostomídeo em um mamífero, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) obter uma amostra do mamífero;

(b) pôr a amostra do mamífero em contato com um ou mais anticorpos que são capazes de se ligar especificamente ao polipeptídeo CoproASP5, que é um fragmento N-terminal de 28 kDa da proteína ASP5, em que o referido polipeptídeo é isolado da matéria fecal, e em que o referido polipeptídeo compreende quatro fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9);

(c) detectar a presença ou a ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou detectar a presença ou a ausência de um ou mais complexos antígeno de ancilostomídeo-anticorpo; e

(d) diagnosticar o mamífero como tendo ou não a infecção por ancilostomídeo com base na detecção da presença ou da ausência de um ou mais antígenos de ancilostomídeo ou um ou mais complexos antígeno de ancilostomídeo-anticorpo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos são obtidos por imunização com um polipeptídeo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a amostra é obtida de um mamífero que é canino.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o ancilostomídeo é *Ancylostoma caninum* ou *Ancylostoma braziliense*.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra fecal.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 não se ligam especificamente a qualquer coproantígeno do grupo que consiste em verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a etapa de detectar a presença ou a ausência de um ou mais complexos antígeno de ancilostomídeo-anticorpo compreende ainda a etapa de prover um anticorpo secundário que se liga a um ou mais complexos antígeno de ancilostomídeo-anticorpo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo secundário é marcado.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 9, caracterizado pelo fato de que um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 são marcados.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 estão imobilizados em um suporte sólido.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido faz parte de um dispositivo para ensaio de imunoabsorção enzimática.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dispositivo para ensaio de imunoabsorção enzimática é um dispositivo para imunoensaio de fluxo lateral.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de pôr a amostra em contato com um ou mais reagentes para detectar um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeo, um ou mais parasitas diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que os reagentes são um ou mais anticorpos ou um ou mais antígenos reconhecidos por anticorpos específicos para um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeo, um ou mais parasitas diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou um ou mais bactérias.

16. Dispositivo para detectar a presença ou a ausência de ancilostomídeo em uma amostra de mamífero, caracterizado pelo fato de que compreende um suporte sólido e um ou mais anticorpos imobilizados no suporte sólido, o um ou mais anticorpos que são capazes de se ligar especificamente ao polipeptídeo CoproASP5, que é um fragmento N-terminal de 28 kDa da proteína ASP5, em que o

referido polipeptídeo é isolado da matéria fecal, e em que o referido polipeptídeo compreende quatro fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9).

17. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 são obtidos por imunização com um polipeptídeo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

18. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que a amostra de mamífero é amostra fecal.

19. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 não se ligam especificamente a qualquer coproantígeno obtido do grupo consistindo em verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração.

20. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, caracterizado pelo fato de que o um ou mais anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo CoproASP5 são marcados.

21. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 20, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo para ensaio de imunoabsorção enzimática.

22. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dispositivo para ensaio de imunoabsorção enzimática é um dispositivo para imunoensaio de fluxo lateral.

23. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 22, caracterizado pelo fato de que o mamífero é canino ou felino.

24. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 23, caracterizado pelo fato de que o dispositivo inclui ainda um ou mais reagentes para a detecção de um ou mais do grupo consistindo em: um ou mais vermes parasitas diferentes de ancilostomídeo, um ou mais parasitas diferentes de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

25. Kit para a detecção de um ou mais antígenos de ancilostomídeo em uma amostra de mamífero, caracterizado pelo fato de que compreende o dispositivo, como definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 24, e um ou mais reagentes suficientes para a detecção do um ou mais antígenos de ancilostomídeo.

26. Kit, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o um ou mais reagentes são selecionados a partir do grupo consistindo em um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos marcadores de anticorpo, um ou mais anticorpos, um ou mais reagentes de captura de antígenos, um ou mais inibidores e um ou mais reagentes de lavagem.

27. Imunocomplexo, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo especificamente ligado ao polipeptídeo CoproASP5 de uma amostra obtida de um mamífero infectado por ancilostomídeo, em que o anticorpo é marcado de forma detectável e em que o polipeptídeo CoproASP5 é um fragmento N-terminal de 28 kDa da proteína ASP5 e compreende quatro fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9).

28. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a amostra é amostra fecal.

29. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o mamífero é ainda infectado com um ou mais de verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração e o

anticorpo não se liga especificamente a qualquer antígeno de um ou mais de verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração que podem estar presentes na amostra.

30. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo está ligado a um suporte sólido.

31. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o imunocomplexo está ligado a um suporte sólido.

32. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um segundo anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo CoproASP5.

33. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o segundo anticorpo está marcado.

34. Imunocomplexo, caracterizado pelo fato de que compreende o polipeptídeo CoproASP5 e um anticorpo especificamente ligado ao polipeptídeo CoproASP5, em que o anticorpo está ligado a um suporte sólido, em que o anticorpo pode se ligar especificamente a um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, e em que o polipeptídeo CoproASP5 é um fragmento N-terminal de 28 kDa da proteína ASP5 e compreende quatro fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9).

35. Imunocomplexo, caracterizado pelo fato de que compreende o polipeptídeo CoproASP5 de uma amostra obtida de um mamífero infectado com ancilostomídeo e um anticorpo especificamente ligado ao polipeptídeo CoproASP5, em que o anticorpo está ligado a um suporte sólido e em que o polipeptídeo CoproASP5 é um fragmento N-terminal de 28 kDa de ASP5 e compreende quatro

fragmentos polipeptídicos KNDLLEDAVKQ (SEQ ID NO:6), KQWYLPVIYYGQRD (SEQ ID NO:7), RLYTFANLAYDKN (SEQ ID NO:8) e KNTALGCHYAKC (SEQ ID NO:9).

36. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra fecal.

37. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o mamífero é ainda infectado com um ou mais de verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração e o anticorpo não se liga especificamente a qualquer antígeno de um ou mais dentre verme cilíndrico, verme-chicote e verme do coração que pode estar presente na amostra.

38. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é marcado de forma detectável.

39. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que o imunocomplexo compreende ainda um segundo anticorpo especificamente ligado ao polipeptídeo CoproASP5.

40. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o segundo anticorpo é marcado.

41. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que CoproASP5 é de uma amostra obtida de um mamífero infectado com ancilostomídeo.

42. Imunocomplexo, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra fecal.

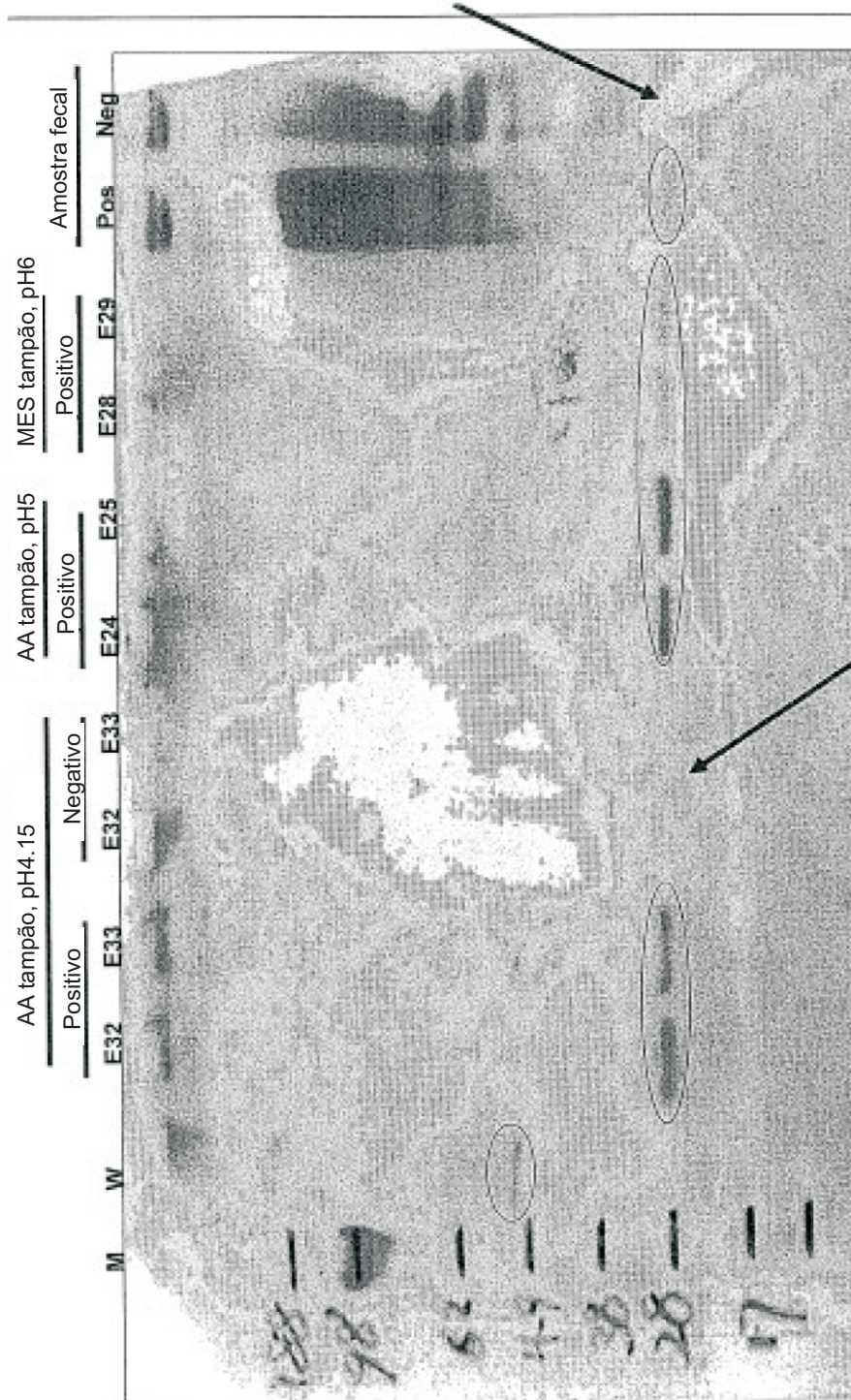
FIG. 1

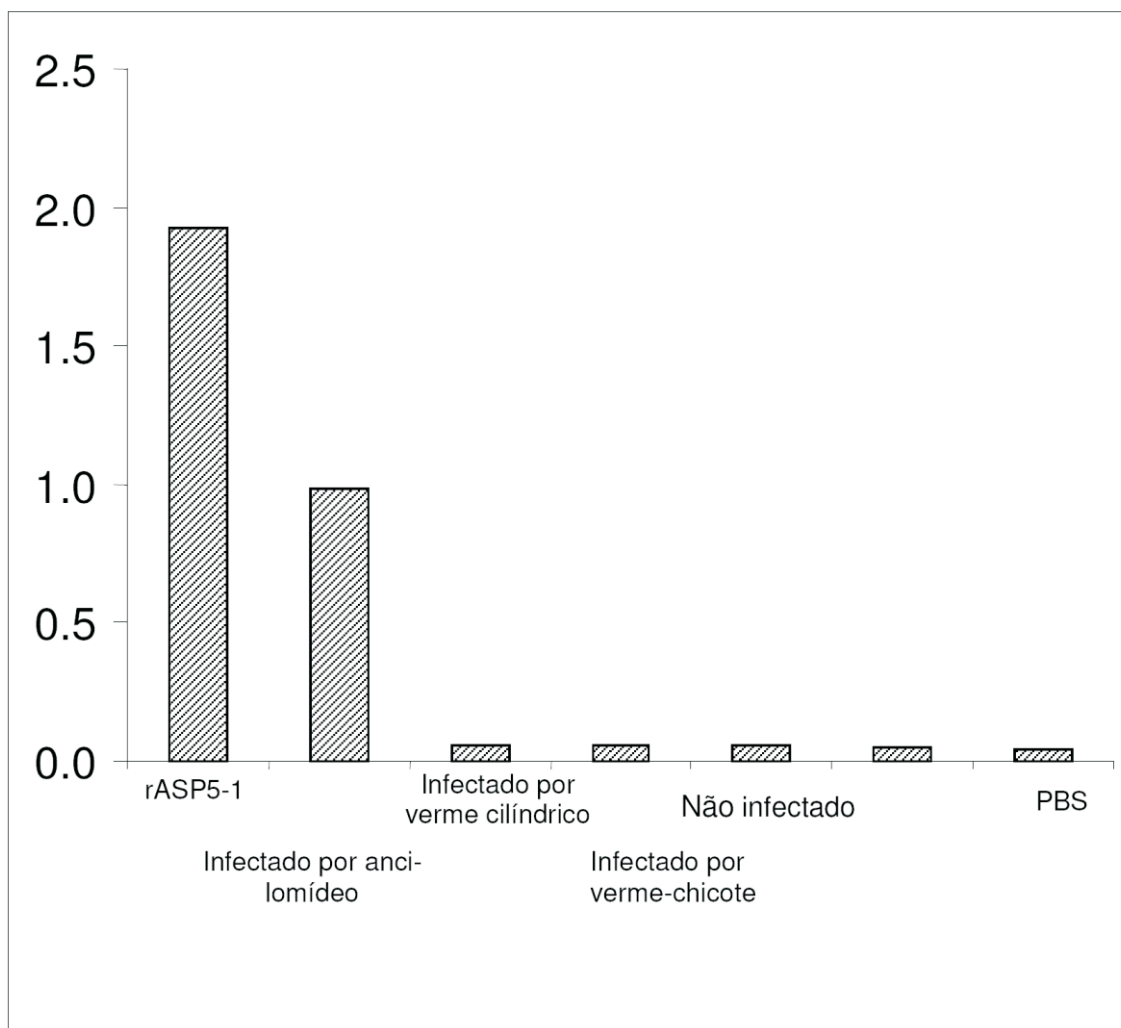
MPNLLLLFLSLPGAILSTTCPGNDLTDARTLLTRVHNSIRREIAQGVANNYHGGKLPAGKNIY
RMRYSCLEEQAAIDASQTFCASLEEPQKYGQNIQAYVTPSIIARP**KNDLLED**AVKQWYLPVIYY
GQRDAANKFTDPRLYTFANLAYD**KNTALGCHYAKC**QGGPDRIVISCMYNNVVPDNAVIEPGTACV
KDACCTTYPQSTCKDSLIIPTPHPPNPPPPAMSP**NAEMTD**AARKKVLGMHNWRRSQVALGNV
QNGKNAYNCPTATDMYKIEYDCDLENSALAYAKQCSLVGSAEGTRPGEGENVHKGALVTDPEAAV
QTAVQAWWSQISQNGLNAQMKFTAFLLKDKPDAPTAFTQMAWAKSVKLGCAVSNCQADTFTVCRYK
AAGNIVGEFIYTKGNVCDACKATCITAEGLCPTP [SEQ ID NO: 5]

- Notes :** 1. KQ é em ambos peptídeo 1 (C-terminal) e 2 (N-terminal)
2. KN é em ambos peptídeo 3 (C-terminal) e 4 (N-terminal)
3. **Asp5-2 é azul**
4. Peptídeos MS:

1.	K. NDLLED AVK . Q	[SEQ ID NO: 6]
2.	K. QWYLPVIY GQR . D	[SEQ ID NO: 7]
3.	R. LYTFANLAYDK . N	[SEQ ID NO: 8]
4.	K. NTALGCHYAK . C	[SEQ ID NO: 9]

FIG. 2



**FIG. 3**

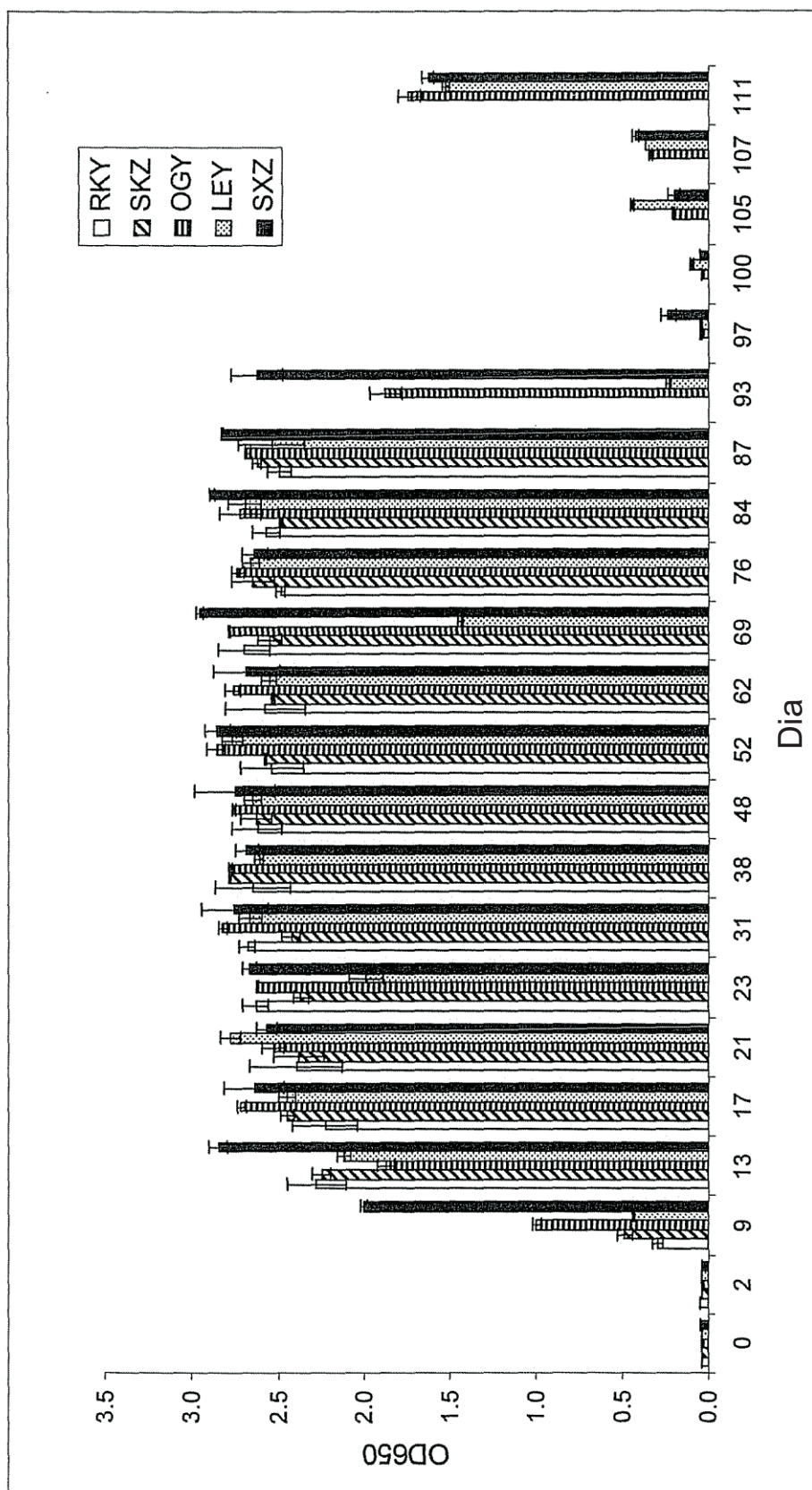
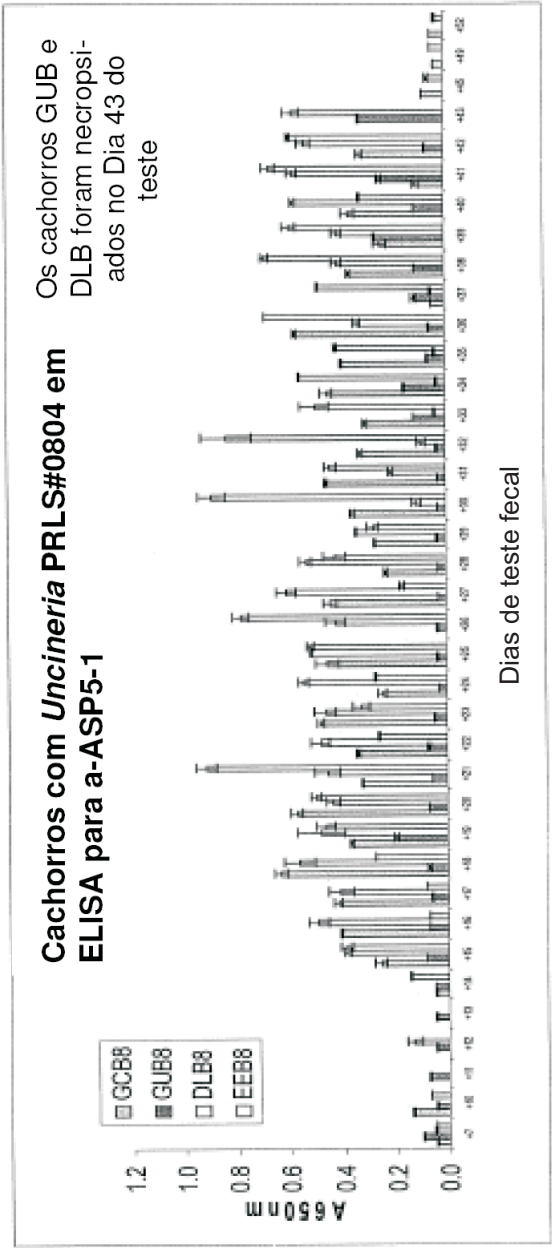


FIG. 4

FIG. 5

ELISA com amostras positivas para PLRS *U. stenocephala* em placa contendo anti-Asp5-1

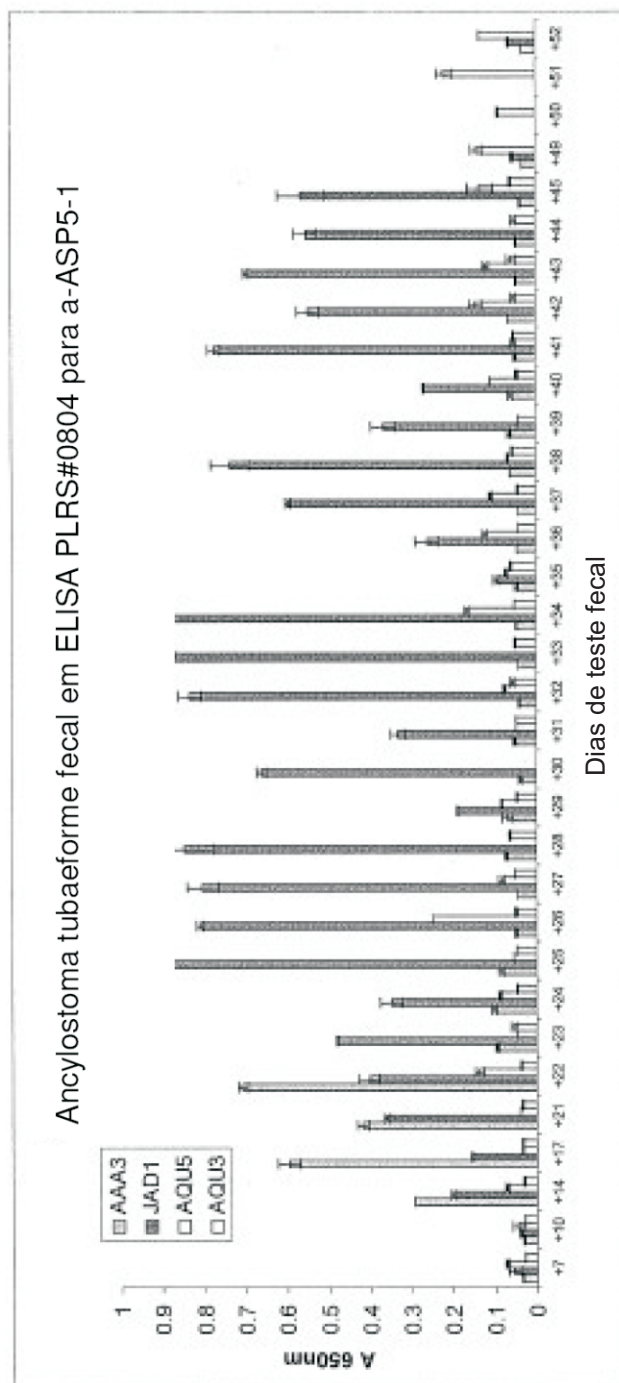
Os cachorros EEB e GCB livraram-se de vermes no Dia 42 do teste



Conclusão: A placa com anti-Asp5-1 pode ser utilizada para detectar cachorros infectos por *U. stenocephala*

FIG. 6

Placa revestida com anti-Asp5-1 pode ser utilizada para detectar gatos infectados com *A. tubaeforme*



Conclusão: gatos infectados com *A. tubaeforme* podem ser detectados por placa revestida com ASP5-1IgG, embora o ELISA não seja tão robusto como o esperado.