



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

(11) PI 0912982-0 B1



(22) Data do Depósito: 18/05/2009

(45) Data de Concessão: 27/08/2019

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, DISPOSITIVO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO A PARTIR DE UMA AMOSTRA, E KIT PARA DETECTAR UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA DE MAMÍFEROS

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

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2008 US 61/128,099.

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

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

(86) Pedido PCT: PCT US2009044399 de 18/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/143080 de 26/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/11/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, DISPOSITIVO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO A PARTIR DE UMA AMOSTRA, E KIT PARA DETECTAR UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA DE MAMÍFEROS A presente invenção refere-se a métodos, dispositivos, kits e composições para detectar a presença ou ausência de nematódeo em uma amostra fecal que são descritos aqui. Os métodos, dispositivos, kits e composições da presente invenção podem ser usados para confirmar a presença ou ausência de nematódeo em uma amostra fecal de um mamífero que também possa estar infectado com um ou mais ancilóstomo, tricurídeo e dirofilária. A confirmação da presença ou ausência de nematódeo no mamífero pode ser feita, por exemplo, com a finalidade de selecionar um curso ideal para tratar os mamíferos e/ou com a finalidade de determinar se o mamífero livrou-se da infecção após o início do tratamento.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA, POLIPEPTÍDEO ISOLADO, DISPOSITIVO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO A PARTIR DE UMA AMOSTRA, E KIT PARA DETECTAR UM OU MAIS ANTÍGENOS DO NEMATÓDEO EM UMA AMOSTRA DE MAMÍFEROS"**.

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] Esta aplicação reivindica prioridade para o pedido provisório de patente Nº serial 61/128099, depositado em 19 de maio de 2008, que é incorporado por referência na sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. Campo da Invenção

[002] A presente invenção refere-se a composições, dispositivos, kits e métodos para detectar nematódeos em mamíferos. Mais particularmente, a presente invenção refere-se à polipeptídeos e composições de polipeptídeos, anticorpos e composições de anticorpos, dispositivos, kits e métodos para detectar a presença ou ausência de antígenos dos nematódeos em uma amostra de um mamífero que também pode incluir um ou mais antígenos de ancilóstomo, tricurídeo e dirofilária.

2. Descrição da técnica anterior

[003] Os nematódeos adultos vivem no intestino delgado e colocam os ovos que passam para as fezes. No ambiente, as larvas infectantes permanecem dentro dos ovos e se desenvolvem em um estágio infectante após cerca de três semanas em uma temperatura favorável. Os ovos infectantes entram num hospedeiro pela ingestão e eclodem no intestino delgado. Em cães com menos de cinco semanas de idade, as larvas migram através dos tecidos e dentro da corrente sanguínea

antes de acabar atingindo o pulmão e a traqueia, onde uma manifestação adicional ocorre. O hospedeiro tosse e engole as larvas, que se transformam em adultos que residem no intestino delgado. As larvas eclodem dentro dos cães com mais de cinco semanas de idade ou dentro de outros animais, incluindo seres humanos, são capazes de viajar em uma ampla variedade de tecidos, incluindo fígado, pulmões, coração, cérebro e músculo esquelético. Essas larvas subsequentemente interrompem seu desenvolvimento e se encistam no tecido do hospedeiro. Em cadelas prenhas e em lactação, as larvas encistadas podem tornar-se reativadas e causar infecção intestinal na mãe, migrar para o útero e contaminar diretamente o feto através da placenta, ou migrar para o tecido mamário e contaminar os filhotes. Os nematódeos parasitas causam doenças não só em seus hospedeiros animais, mas também são agentes etiológicos de síndrome de larvas migrantes, bem como a enterite grave e reações alérgicas nos seres humanos, que ocorre após a ingestão de ovos infecciosos do meio ambiente ou pela ingestão de larvas encontradas no fígado, carne ou outros tecidos dos hospedeiros paratênicos.

[004] A infecção de nematódeos intestinais é comum em animais e, se não for tratada, pode causar doenças graves e até morte. Embora seja relativamente fácil diagnosticar um animal infectado com nematódeo como tendo uma infecção com verme parasitário (helmintos) de algum tipo, é significativamente mais difícil identificar o nematódeo, especificamente, como o verme causador. Este é um problema porque as infecções por nematódeos são melhores tratadas quando o cuidador do animal infectado tem conhecimento de que o nematódeo é a fonte específica de infecção. Além disso, os seres humanos que possam entrar em contato com o animal infestado ou com suas excreções podem ser aconselhados a tomar precauções contra a aquisição do parasita. Neste contexto, é importante determinar as espécies do ver-

me com alta especificidade, tais como alguns helmintos, como nematódeos e ancilóstomos, pode causar doença significativa (por exemplo, larvas migrantes) em humanos, embora seja geralmente aceito que o tricurídeo não desempenhe um papel de importância zoonótica em humanos.

[005] Os métodos atuais para diagnóstico de infecções por nematódeos envolvem principalmente o exame microscópico de amostras fecais, quer diretamente nos esfregaços fecais ou após a concentração de ovos por flutuação em meios de densidade. Apesar da alta adoção desse procedimento, o método tem deficiências significativas. Estes métodos microscópicos são demorados, desagradáveis, exigem equipamentos especializados e podem ter baixa especificidade [Dryden *et al.*, 2005, Vet Therap. 6 (1), 15-28]. Além disso, a precisão dos resultados desses métodos é altamente dependente da habilidade e perícia do operador.

[006] A manipulação de fezes é desagradável e perigosa. Os procedimentos sanitários e inofensivos para o processamento das fezes são inoportunos e muitas vezes complexos. Esses processos podem incluir pesagem, centrifugação e armazenagem, e é difícil, exceto em um laboratório de análises clínicas equipados com aparelhos adequados, equipamentos de proteção, e um versado na técnica. Portanto, qualquer redução no número de etapas necessárias para realizar um teste fecal e qualquer redução em contato entre o operador de teste e o material de teste é desejável. Os laboratórios clínicos têm usado os métodos de imunoensaio para a detecção de diversos vírus, bactérias e parasitas não helmintos e organismos nas fezes. No entanto, continua havendo uma necessidade de um método simples de imunoensaio para a detecção de uma infecção por vermes parasitas e infecções por nematódeos, em particular nas fezes, no sangue todo ou no soro.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Em um aspecto, a invenção inclui anticorpos que se ligam especificamente a um polipeptídeo incluindo a totalidade ou uma porção antigênica da sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, como listadas aqui, ou a um polipeptídeo incluindo uma sequência que é uma variante conservadora de uma dessas sequências. Em outro aspecto, os anticorpos se ligam especificamente ao antígeno de mamíferos infestados com nematódeos, mas não se ligam especificamente ao antígeno de mamíferos infectados com ancilóstomo, dilofilária e/ou tricurídeo.

[008] Em outro aspecto, a invenção inclui anticorpos que são obtidos por imunização com o polipeptídeo incluindo a totalidade ou uma porção antigênica da sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7, ou com um polipeptídeo incluindo uma sequência que é uma variante conservadora de uma dessas sequências.

[009] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um dispositivo para detectar a presença ou ausência de antígenos de nematódeos a partir de uma amostra; o dispositivo compreendendo um suporte sólido, onde o suporte sólido tenha imobilizado nele um ou mais anticorpos que são capazes de se ligar especificamente a um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido que corresponde a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou uma porção antigênica da mesma. O dispositivo pode ser, mas não se limita a, por exemplo, um dispositivo ELISA, tal como um dispositivo de imunoenensaio de fluxo lateral ou um dispositivo de placa de microtitulação. As amostras de mamíferos que podem ser testadas para nematódeo pelo dispositivo incluem, mas não estão limitadas a serem fezes, sangue total, soro, leite materno e tecido total, tais como o tecido da

glândula mamária, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, músculo e olho, por exemplo. O dispositivo ainda pode incluir, mas não necessita incluir, um ou mais reagentes para a detecção de um ou mais do grupo que consiste em: um ou mais vermes parasitas não nematódeos, um ou mais parasitas não vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, e uma ou mais bactérias.

[0010] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método para detectar a presença ou ausência de nematódeo, como *Toxocara canis* (*T. canis*), *Toxocara cati* (*T. cati*), *Toxocara vitulorum* (*T. vitulorum*), *Toxascaris leonina* (*T. leonina*), *Baylisascaris procyonis* (*B. procyonis*), *Ascaridia galli* (*A. galli*), *Parascaris equorum* (*P. equorum*), *Ascaris suum* (*A. suum*), *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*), *Anisakis simplex* (*A. simplex*), ou *Pseudoterranova decipiens* (*P. decipiens*), por exemplo, em uma amostra. A amostra pode ser obtida de um mamífero, como um canino, felino, suíno, bovino, humano, cetáceo ou pinípedes. Em um aspecto, o método é realizado para testar uma amostra fecal para coproantígeno de nematódeo. O método, no entanto, não se limita a ser realizado para testar uma amostra fecal. Além de fezes, a amostra, portanto, pode ser, mas não está limitada a ser, sangue total, soro, leite materno e todo tecido, tais como tecido da glândula mamária, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, músculo e olho, por exemplo. Etapas do método incluem colocar a amostra em contato com um ou mais dos anticorpos da invenção; formar complexos polipeptídeo-anticorpo na presença dos polipeptídeos, se houver, na amostra; e detectar a presença ou ausência dos complexos polipeptídeo-anticorpo, se houver. O método ainda pode incluir uma ou mais das etapas opcionais para diagnosticar o mamífero como tendo ou não uma infecção por nematódeo e determinar se um ácido nucleico do nematódeo está presente na mesma amostra que foi colocada em contato com os anticorpos com a finalidade de detectar a

presença ou ausência de nematódeo ou em alguma outra amostra do mamífero. O método também pode ser usado para testar a contaminação ambiental com nematódeo. As amostras ambientais que podem ser testadas para o nematódeo pelo dispositivo inclui, mas não estão limitadas ao solo, decomposição de matéria ou matéria fecal de ambientes residenciais, incluindo quintais, jardins, caixas de areia e áreas de recreação. Locais de teste também podem incluir parques, praias, florestas, fazendas ou outros locais expostos ao material fecal de cães, gatos ou outros hospedeiros mamíferos de nematódeos. Fezes de caixas de areia internas e externas também podem ser testadas.

[0011] Em ainda outro aspecto, a presente invenção inclui um kit para a realização de uma ou mais etapas do método da invenção. O kit pode opcionalmente incluir, por exemplo, o dispositivo e uma ou mais das composições da presente invenção e instruções para realizar o método da presente invenção. O kit pode ainda, opcionalmente, incluir, por exemplo, um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos de marcadores 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 usados como parte do dispositivo e/ou a serem usados na realização do método.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0012] A figura 1 mostra a sequência de nucleotídeos de uma sequência de cDNA de 535 nucleotídeos de adulto completo de *Toxocara canis*. (SEQ ID NO: 1).

[0013] A figura 2 mostra a sequência de nucleotídeos de uma sequência de cDNA de 536 nucleotídeos de adulto completo de *Toxocara cati*. (SEQ ID NO: 2).

[0014] A figura 3 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de uma ORF grande de SEQ ID NO: 1. O códon de parada é indicado por *.

[0015] A figura 4 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de uma ORF grande de SEQ ID NO: 2. O códon de parada é indicado por *.

[0016] A figura 5 mostra um alinhamento de comparação de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5. A sequência consenso de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5 é mostrada como SEQ ID NO: 7.

[0017] A figura 6A mostra um dispositivo de placa multipoço da presente invenção.

[0018] A figura 6B mostra uma aproximação de um único poço da placa da figura 6A com um anticorpo específico da presente invenção imobilizado nele.

[0019] A figura 7 mostra um primeiro gráfico de valores de densidade óptica (OD) obtidos de amostras fecais de caninos infectados por nematódeos, ancilóstomo, tricurídeo ou caninos infectados, seguindo o método da presente invenção em um primeiro exemplo.

[0020] A figura 8 mostra um segundo gráfico de valores OD obtidos de amostras de fezes de caninos infectados com dirofilária, seguindo o método da presente invenção, no primeiro exemplo.

[0021] A figura 9 mostra os resultados de um primeiro ensaio ELISA, que foi realizado através de uma placa de microtitulação e que testou amostras fecais de caninos infectados com nematódeo, ancilóstomo, tricurídeo ou dirofilária, seguindo o método da presente invenção em um segundo exemplo.

[0022] A figura 10A mostra os resultados de um segundo ensaio ELISA, que foi realizado usando um dispositivo de fluxo lateral e que testaram amostras fecais de caninos infectados com o nematódeo, seguindo o método da presente invenção em um terceiro exemplo.

[0023] A figura 10B mostra os resultados de um terceiro ensaio ELISA, que foi realizado usando um dispositivo de fluxo lateral e que testou amostras fecais de caninos que não foram infectados com o

nematódeo, seguindo o método da presente invenção no terceiro exemplo.

[0024] A figura 11 mostra um primeiro gráfico de valores OD obtidos de amostras fecais de um conjunto de caninos que tinha uma infecção ativa por nematódeo e de amostras fecais desses caninos que depois que tiverem se livrado da infecção ativa por nematódeo, seguindo o método da presente invenção em um quarto exemplo.

[0025] A figura 12 mostra um segundo gráfico de valores OD obtidos de amostras fecais de um conjunto de felinos que não tinha uma infecção por vermes parasitários, seguindo o método da presente invenção no quarto exemplo.

[0026] A figura 13 mostra um gráfico de valores OD obtidos de amostras fecais de felinos infectados por nematódeo, seguindo o método da presente invenção em um quinto exemplo.

[0027] A figura 14 mostra um primeiro gráfico de valores OD obtidos de amostras de fezes de um conjunto de felinos que tinha uma infecção ativa por nematódeo e de amostras fecais desses felinos, depois de terem sido livrados da infecção ativa por nematódeo, seguindo o método da presente invenção em um sexto exemplo.

[0028] A figura 15 mostra um segundo gráfico de valores OD obtidos de amostras fecais de um conjunto de felinos que não tinham uma infecção por vermes parasitários, seguindo o método da invenção presente no sexto exemplo.

[0029] A figura 16 mostra um ensaio ELISA com frações de eluição de uma coluna de sulfopropila (SP) como amostras e que Copro6728 pode ser parcialmente purificado e enriquecido por eluição da coluna SP, seguindo o método da invenção presente no sétimo exemplo.

[0030] A figura 17 mostra que o peso molecular do Copro628 era de cerca de 7KD usando uma sonda western Blot com IgG-HRP

DIV6728 de sequência completa antioelho, seguindo o método da invenção presente no sétimo exemplo.

[0031] A figura 18 mostra que o peso molecular do Copro6728 era cerca de 7KD usando um gel SDS-PAGE corado com Coloração de Proteína Imperial, seguindo o método da invenção presente no sétimo exemplo.

[0032] A figura 19 mostra a sequência de aminoácido do DIV6728 de sequência completa (SEQ ID NO: 5) com os dois peptídeos (SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9) identificada por análise de Espectrometria de Massa identificada, realçando-os nas caixas sombreadas, seguindo o método da invenção presente no sétimo exemplo.

[0033] A figura 20 mostra um alinhamento das sequências de aminoácidos 6728N (SEQ ID NO: 10) e 6728C (SEQ ID NO: 11) codificadas pelas construções, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0034] A figura 21 mostra um gel SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação do 6728N recombinante, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0035] A figura 22 mostra um gel de SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação do 6728C recombinante, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0036] A figura 23 mostra os dados obtidos do ensaio ELISA com diferentes amostras fecais para testar os diferentes anticorpos policlonais contra 6728 proteínas diferentes recombinantes, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0037] A figura 24 mostra os dados obtidos do ensaio ELISA com proteínas recombinantes para testar os diferentes anticorpos policlonais contra 6728 proteínas recombinantes diferentes, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0038] A figura 25 mostra western blotting com diferentes sondas

de amostras fecais com IgG-HRP DIV6728 de sequência completa antioelho, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0039] A figura 26 mostra western blotting com diferentes sondas de amostras fecais com IgG-HRP 6728C antioelho, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

[0040] A figura 27 mostra western blotting com diferentes sondas de amostras fecais com IgG-HRP 6728N antioelho, seguindo o método da presente invenção no oitavo exemplo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS DA INVENÇÃO

Introdução

[0041] A presente invenção é geralmente dirigida a métodos, dispositivos, kits e composições para detectar nematódeo em uma amostra obtida de um mamífero. A presente invenção refere-se a antígenos de nematódeo do *Toxocara*, como o *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, por exemplo. Em particular, a presente invenção refere-se a polipeptídeos de *Toxocara* e seus variantes conservadores, polinucleotídeos que codificam esses polipeptídeos e oligonucleotídeos que se ligam especificamente a esses polinucleotídeos, anticorpos que são produzidos contra e que especificamente se ligam aqueles polipeptídeos e métodos, dispositivos e kits para a detecção de nematódeos, tais como *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris*, *Ascaris*, *Anisakis*, ou *Pseudoterranova*, incluindo o *T. canis*, *T. cati*, *T. vitulorum*, *T. leonina*, *B. procyonis*, *A. galli*, *P. equorum*, *A. lumbricoides*, *A. suum*, *A. simplex*, ou *P. decipiens*, por exemplo.

[0042] A presente invenção fornece uma alternativa superior às técnicas existentes de inspeção microscópica. Isto é verdade porque a presente invenção fornece dispositivos, kits e métodos para a detecção da presença ou ausência de nematódeo em uma amostra de um mamífero que: (1) é fácil de usar e rende resultados consistentemente

confiáveis; (2) permite a ausência ou presença de nematódeos em um mamífero a ser confirmado independentemente de o mamífero está infectado com ancilóstomo, tricurídeo e/ou dirofilária; (3) pode detectar nematódeo antes da hora em que os ovos aparecem primeiro nas fezes do hospedeiro infectado, e (4) pode distinguir entre o nematódeo e outras infecções por helmintos.

[0043] A invenção atual é baseada em parte na descoberta de uma propriedade inesperada das composições da presente invenção. Especificamente, foi determinado que um anticorpo da presente invenção produzido contra um polipeptídeo da presente invenção pode ser usado para captura e detecção de antígenos de nematódeos em um mamífero, mesmo quando o mamífero também é infestado por um ou mais tricurídeo, ancilóstomo e dirofilária. Esta especificidade do nematódeo é surpreendente, porque os nematódeos, tricurídeos, ancilóstomos e dirofilárias todos são nematódeos relacionados, e um anticorpo produzido contra uma proteína isolada de qualquer um desses vermes seria esperado para reagir de forma cruzada com um ou mais dos outros vermes, antígenos hospedeiros, ou outros componentes hospedeiros.

[0044] A presente invenção inclui, portanto, métodos, dispositivos, composições e kits que usam anticorpos e/ou fragmentos dos mesmos para capturar e detectar especificamente coproantígenos de nematódeos em um mamífero que também pode ser infestado por um ou mais tricurídeo, ancilóstomo e dirofilária. A capacidade da presente invenção para detectar e diagnosticar nematódeo mesmo quando um ou mais tipos de vermes também estão presentes permite que o cuidador de mamíferos tenha a oportunidade para selecionar de forma ideal um tratamento para se livrar do nematódeo do mamífero.

Definições e Usos do Termo

[0045] O termo "composições da invenção" refere-se a todos os

ácidos nucleicos, polipeptídeos, anticorpos, e misturas que incluem um ou mais desses ácidos nucleicos, polipeptídeos e anticorpos e um ou mais compostos, que podem ser usados para detectar a presença ou ausência de nematódeos em uma amostra obtida de um mamífero através da realização do método da presente invenção que é descrito explicitamente, implicitamente englobado ou descrito aqui.

[0046] "Uma amostra de um mamífero", em que o nematódeo pode ser detectado pela presente invenção inclui todos os componentes corporais e seus extratos, tal como qualquer líquido, sólido, célula ou tecido que são capazes de conter antígeno do nematódeo. Amostras exemplares, portanto, incluem, mas não se limitam a, fezes, leite, sangue total, e porções dos mesmos, incluindo soro, e ainda incluem extratos de tecidos, incluindo tecido da glândula mamária, intestino, fígado, coração, pulmão, esôfago, cérebro, músculo, e olho, por exemplo. A amostra pode ser tirada diretamente de mamíferos ou a amostra pode ser tirada de qualquer coisa que tenha entrado em contato com o mamífero. Por exemplo, a amostra pode ser fresca ou excrementos fecais em decomposição do mamífero. Como outro exemplo, a amostra pode incluir terra, sujeira, areia, material de plantas, ou qualquer outro material que possa ser misturado com componentes do organismo que possam ser deixados para trás por um mamífero, como fezes, por exemplo. Não importa a origem ou o conteúdo da amostra, esta amostra às vezes é referida aqui como a "amostra de mamíferos", a "amostra de teste" ou a "amostra sob teste".

[0047] Tal como usado neste documento, "ácido nucleico" é sinônimo de, e, portanto, é usado como sinônimo de "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 única. Além disso, um ácido nucleico é naturalmente isolado, como a partir de um nematódeo inteiro

ou uma parte dele, por exemplo, ou é sintetizado artificialmente, em um organismo hospedeiro recombinante artificial ou por qualquer outro meio artificial conhecido pelo versado, tais como, empregando uma técnica baseada em PCR, ao criar 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.

[0048] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são termos sinônimos que são usados alternadamente aqui para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Um polipeptídeo, peptídeo e proteína da presente invenção podem ser tanto isolados naturalmente, como a partir de um nematódeo inteiro ou de uma porção de nematódeo, por exemplo, ou sintetizados artificialmente, quer em um organismo hospedeiro recombinante ou por qualquer outro meio artificial conhecido pelo versado.

[0049] O termo "anticorpos" ou "anticorpos da invenção atual" refere-se a qualquer anticorpo que é capaz de se ligar especificamente a uma ou mais antígenos do nematódeo, mas não a qualquer antígeno de ancilóstomo, tricurídeo ou dirofílaría. Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos contra um ou mais polipeptídeos imunogênicos da presente invenção. Salvo contrário, é para 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, onde um dos dois tipos se liga especificamente a um antígeno em particular e o outro dos dois tipos se liga especificamente a algum outro antígeno.

[0050] O "polipeptídeo imunogênico da presente invenção" e, mais simplesmente, "o polipeptídeo da presente invenção", é um imunógeno contra o qual os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos. Todos os "polipeptídeos da presente invenção" são imunogênicos e, portanto, podem ser usados para induzir uma resposta imune em

um animal hospedeiro para produzir anticorpos da presente invenção. Salvo disposição em contrário, é para ser entendido que o polipeptídeo da presente invenção pode ser um componente de uma composição mista de uma pluralidade de componentes.

[0051] Um "imunogênico" é qualquer agente, como o polipeptídeo imunogênico da presente invenção, por exemplo, que seja capaz de induzir uma resposta imunológica em um animal que está exposto a esse agente.

[0052] O termo "nematódeo", tal como usado aqui, refere-se a helmintos, tais como nematódeos intestinais da ordem *Ascaridida*, que inclui os gêneros *Toxocara*, *Toxascaris*, *Baylisascaris*, *Ascaridia*, *Parascaris*, *Ascaris*, *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Assim, o termo "nematódeo", tal como usado aqui, não se refere à totalidade do filo Nematoda. Portanto, "nematódeo" não inclui qualquer membro do gênero *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Necator*, *Trichuris* ou *Dirofilaria*.

[0053] Um "coproantígeno nematódeo" ou "coproantígeno de nematódeo" é qualquer produto de nematódeo que está presente nas fezes de um mamífero com uma infecção por nematódeo e que pode ser especificamente ligado por um ou mais anticorpos da invenção. Por exemplo, um coproantígeno de nematódeo pode ser, mas não está limitado a ser um ou mais dos polipeptídeos da invenção. Os presentes inventores determinaram que uma nova isoforma 7 kD C-terminal de DIV6728, que é uma proteína excretora/secretora de *T. canis*, está presente nas fezes de caninos infectados por *T. canis* tão precoce quanto 38 dias após a primeira vez que os caninos foram infectados com *T. canis*. Portanto, um "coproantígeno nematódeo" pode ser esta nova isoforma 7 kD C-terminal de DIV6728 (que é referida aqui como "Copro6728"), que foram observadas nas fezes caninas pelos presentes inventores.

[0054] "Específico para", "se liga especificamente", e "se liga de

forma estável" significa que uma composição particular da invenção, tal como um anticorpo, polipeptídio, ou oligonucleotídeo da presente invenção, por exemplo, reconhece e se liga a um ou mais agentes com maior afinidade do que a pelo menos outro agente. Como um exemplo, um anticorpo da presente invenção é dito ser "específico para", "se liga especificamente", e "se liga de forma estável" antígenos de nematódeo sempre que o anticorpo for capaz de reconhecer e se ligar aos antígenos do nematódeo com maior afinidade do que a qualquer outro antígeno de um verme parasitário não nematódeo. Tal especificidade de ligação pode ser testada usando a metodologia conhecida na técnica, por exemplo, ELISA ou radioimunoensaio (RIA). Com base na informação observada em relação à especificidade de ligação de uma composição particular da invenção, o método da presente invenção pode ser realizado em condições que permitem que a composição se ligue (e, portanto, permitir a detecção de tal ligação) a um agente particular ou agentes, mas não se liga significativamente a outros agentes, enquanto essas condições são mantidas. Como um exemplo, o método da presente invenção pode ser realizado sob condições que permitam um anticorpo da presente invenção se ligar (e, portanto, permitir a detecção de tal ligação) a um ou mais antígenos do nematódeo presente em uma amostra particular, mas não significativamente a qualquer antígeno do ancilóstomo, tricurídeo, ou dirofilária que possa estar presente nesta amostra.

[0055] "Detectar nematódeo" significa detectar um ou mais produtos específicos de nematódeo, incluindo um ou mais dos polipeptídeos, anticorpos e ácidos nucleicos da presente invenção, ou um ou mais antígenos de nematódeo, ou Copro6728, por exemplo. A presença de um ou mais produtos de nematódeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero tem uma infecção por nematódeo, independentemente de qualquer organismo nematódeo inteiro ou

ovo do mesmo também está presente nessa amostra. Por outro lado, a ausência de um ou mais produto de nematódeo em uma amostra de um mamífero é indicativo de que o mamífero não tem uma infecção por nematódeo.

[0056] "Aminoácido" refere-se aos amino ácidos sintéticos e de ocorrência natural. Resíduos de aminoácidos estão abreviados da seguinte forma: Alanina é A ou Ala; Arginina é R ou Arg; Asparagina é N ou Asn, Ácido aspártico é D ou Asp; Cisteína é C ou Cis, Ácido glutâmico é E ou Glu; Glutamina é Q ou Gln; glicina é G ou Gli; Histidina é H ou His; Isoleucina é I ou Ile; Leucina é L ou Leu; Lisina é K ou Lis; Metionina é M ou Met; Fenilalanina é F ou Fe; Prolina é P ou Pro; Serina é S ou Ser; Treonina é T ou Tr; Triptofano é W ou Trp; Tirosina é Y ou Tir, e Valina é V ou Val. Salvo nos casos definidos em contrário, X ou Xaa representa qualquer aminoácido. Outros aminoácidos relevantes incluem, mas não estão limitados a serem 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina. Em todos os casos, a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo descrito ou referido aqui é apresentada na forma convencional em que o primeiro resíduo de aminoácido ou o mais a esquerda da sequência é o resíduo N-terminal e o último resíduo de aminoácido ou o mais à direita da sequência é o resíduo C-terminal.

[0057] Uma "variante conservadora" de qualquer sequência de ácido nucleico particular inclui qualquer sequência com uma ou mais substituições de códons degenerados para aquela sequência de ácido nucleico particular, qualquer sequência tendo uma ou mais substituições, inserções e deleções de nucleotídeos daquela sequência de ácido nucleico particular, e a sequência complementar daquele ácido nucleico particular e as variantes conservadoras daquela sequência complementar. Variantes conservadoras de uma sequência de ácido nucleicos particular tem, de preferência, identidade, pelo menos, cerca de 85% de identidade, mais preferencialmente tem, pelo menos, cerca

de 90% de identidade, e ainda mais preferivelmente, pelo menos cerca de 95 a 99% de identidade, para aquela sequência de ácido nucleico particular. As variantes conservadoras de uma sequência de ácido nucleico particular podem ser sintetizadas artificialmente ou podem ser isoladas em sua forma natural de um organismo, incluindo de um organismo de nematódeo, como *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, por exemplo.

[0058] Uma "variante conservadora" de qualquer sequência polipeptídica particular é qualquer polipeptídeo com uma sequência de aminoácido que varia da sequência de aminoácido daquele polipeptídeo particular, mas ainda retém as propriedades específicas de ligação daquele polipeptídeo particular, de tal forma que um anticorpo da presente invenção que é produzido contra o polipeptídeo particular é capaz de se ligar especificamente ao polipeptídeo variante. Assim, por exemplo, uma variante conservadora de um polipeptídeo particular pode ter uma ou mais substituições, exclusões, adições e inserções de aminoácidos para o polipeptídeo particular. Por exemplo, um variante conservado de um polipeptídeo particular pode ter 30 ou menos, 25 ou menos, 20 ou menos, 15 ou menos, 10 ou menos, ou 5 ou menos, substituições do ácido aminado conservados para aquele polipeptídeo particular. Variantes conservadoras de um polipeptídeo particular de preferência, mas não essencialmente, tem pelo menos cerca de 80% de identidade, mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 90% de identidade, e ainda mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 91 a 99% de identidade para aquele polipeptídeo particular. Um percentual de identidade para qualquer sequência submetida de ácido nucleico ou de aminoácidos (por exemplo, qualquer um dos polipeptídeos descritos aqui) em relação à outra sequência de aminoácidos ou ácido nucleico "alvo" ou pode ser determinado como se segue. Primeiro, uma sequência de aminoácidos ou ácido nucleico "alvo" da invenção pode

ser comparada e alinhada a sequência submetida de aminoácidos um ácido nucleico, usando o programa de sequências BLAST 2 (BI2seq) a partir da versão única de BLASTZ contendo BLASTN e BLASTP (por exemplo, versão 2.0.14). A versão única do BLASTZ pode ser obtida em www.ncbi.nlm.nih.gov. Instruções explicando como usar BLASTZ e, especificamente, o programa BI2seq, podem ser encontradas no arquivo “leia-me” que acompanha o BLASTZ. Os programas também são descritos em detalhe 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.

[0059] "Copro6728" refere-se a uma porção 7kD C-terminal de DIV6728 encontrada nas fezes de mamíferos. Em uma modalidade específica, copro6728 não inclui o C-terminal do DIV6728 comprimento total.

[0060] BI2seq realiza uma comparação entre a sequência submetida e uma sequência-alvo usando o algoritmo BLASTN (usado para comparar sequências de ácido nucleico) ou BLASTP (usado para comparar sequências de aminoácidos). Tipicamente, os parâmetros padrão de uma matriz de escore BLOSUM62, custo de existência gap de 11 e custos de extensão de 1, um tamanho lambda de 3, um valor de espera 10, um custo por resíduo de 1 e uma proporção de lambda de 0,85 são usadas ao realizar o alinhamento das sequências de aminoácidos. O arquivo de saída contém regiões alinhadas, de homologia entre a sequência-alvo e a sequência do sujeito. Uma vez alinhado, um comprimento é determinado pela contagem do número de nucleotídeos consecutivos ou resíduos de aminoácidos (isto é, excluindo gaps) da sequência-alvo que se alinha com a sequência da sequência do sujeito iniciando com qualquer posição combinada e terminando com qualquer outra posição combinada. Uma posição combinada é uma posição onde um nucleotídeo idêntico ou resíduo de aminoácido

está presente numa sequência-alvo ou do sujeito. Os gaps de um ou mais resíduos podem ser inseridos em uma sequência-alvo ou do sujeito para maximizar o alinhamento das sequências entre os domínios estruturalmente conservados (por exemplo, α -hélices, β -folhas, e alças).

[0061] A identidade da percentagem ao longo de um comprimento específico é determinada pela contagem do número de posições combinadas ao longo desse comprimento específico, dividindo esse número pelo comprimento e multiplicando o valor resultante por 100. Por exemplo, se (i) uma sequência-alvo de 500 aminoácidos for comparada a uma sequência de aminoácido submetida, (ii) o programa BL2seq apresenta 200 aminoácidos da sequência-alvo alinhados com a região da sequência submetida em que o primeiro e último dessa região de 200 aminoácidos são combinados, e (iii) o número de combinações ao longo desses 200 aminoácidos alinhados é de 180, então a sequência-alvo de 500 aminoácidos contém um comprimento de 200 e uma identidade da sequência ao longo do comprimento de 90% (ou seja, $180/200 \times 100 = 90$). Será apreciado que uma sequência-alvo de ácido nucleico ou de aminoácidos que se alinha com uma sequência submetida possa resultar em vários comprimentos diferentes com cada comprimento tendo sua própria percentagem de identidade. É observado que o valor da percentagem da identidade pode ser arredondado para o décimo mais próximo. Por exemplo, 78,11, 78,12, 78,13 e 78,14 é arredondado para baixo para 78,1, enquanto 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 e 78,19 é arredondado para cima para 78,2. É também observado que o valor de comprimento será sempre um número inteiro.

[0062] As variantes conservadoras de uma sequência polipeptídica particular podem ser sintetizadas artificialmente ou podem ser isoladas em sua forma natural de um organismo, incluindo um organismo do nematódeo, como *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, por exemplo. Em

um exemplo específico, o polipeptídeo da invenção tendo uma sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 4 mostrada abaixo é uma variante conservadora do polipeptídeo da presente invenção tendo uma sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 3, na qual a SEQ ID NO: 4 é mais de 96% idêntica a SEQ ID NO: 3 sobre um alinhamento de 128 aminoácidos. Em termos mais gerais, cada uma das SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7 são variantes conservadoras umas das outras. Também é preciso entender que outras variantes conservadoras da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 11 são contempladas pela presente invenção como descritas aqui, mas o versado reconhecerá que todas essas variantes contempladas são muito numerosas para serem listadas. O versado também reconhecerá que essas variantes incluem, mas não são limitadas a, aquelas que têm uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos básicos, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos ácidos, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos polares, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos aromáticos e uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos pequenos. (resíduos de aminoácidos "básicos" são K, R e H. Resíduos de aminoácidos "ácidos" são D e E. Resíduos de aminoácido "polares" são N e Q. Aminoácidos "hidrofóbicos" são I, L e V. Resíduos de aminoácidos "aromáticos" são F, Y e W. Aminoácidos "pequenos" são G, S, A, T e M).

A. Ácidos Nucleicos e polipeptídeos da invenção

[0063] Uma parte dos ácidos nucleicos e polipeptídeos da invenção são descritos em detalhes na Aplicação Provisória: "Métodos, Dispositivos, Kits e Composições para detectar Nematódeos", Nº serial do pedido 61/128099, depositado em 19 de maio de 2008, que é incorpo-

rado por referência, na sua totalidade.

[0064] Em uma tentativa de identificar composições que possam ser usadas para confirmar a presença ou ausência de nematódeos em uma amostra fecal, uma pluralidade de iniciadores de oligonucleotídeo foi desenhada, sintetizada e usada em 5'RACE, 3'RACE e reações de RT-PCR que incluem RNA total isolado do adulto completo do *Toxocara canis* ou adulto completo do *Toxocara cati*. Como resultado destes esforços, uma sequência de 535 nucleotídeos do cDNA foi deduzida do *Toxocara canis* (esta sequência é mostrada na figura 1 e é identificada aqui como SEQ ID NO: 1), e uma sequência de 536 nucleotídeos do cDNA foi deduzida do *Toxocara cati* (esta sequência é mostrada na figura 2 e é identificada aqui como SEQ ID NO: 2). (Pesquisas BLAST que foram realizadas usando a SEQ ID NO: 1 e a SEQ ID NO: 2 indicaram que estas sequências são susceptíveis de codificar um membro de uma família inibidora da protease serina específica, que foi pela primeira vez identificado no *Ascaris*, mas que não foi identificado nem no *T. canis* nem no *T. cati* até agora.)

[0065] Análise das sequências correspondentes as SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 indicou que cada uma dessas sequências contém uma fase de leitura aberta grande (ORF). Especificamente, como mostrado na figura 3, a ORF grande da SEQ ID NO: 1 corresponde de 28 a 456 nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 e é previsto que codifique um polipeptídeo com a seguinte sequência de aminoácidos:

MLSVLALFALITFAVAGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPS
CECSPGRGMRRRTNDGRCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCA
QRFPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:3).

[0066] Mais adiante, como mostrado na figura 4, a ORF grande da SEQ ID NO: 2 corresponde de 29 a 457 nucleotídeos da SEQ ID NO: 2, é previsto que codifique um polipeptídeo com a seguinte sequência de aminoácidos:

MLSVLALFALITFAVADPKSCGPNEVWTECTGCELKCGQDEDTPCTLNCRPPS
 CECSPGRGMRRITDIDGRICIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCA
 QRFVPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAAGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:4).

[0067] Os polipeptídeos da presente invenção são codificados por ácidos nucleicos que têm uma sequência de nucleotídeos que corresponde à totalidade ou à porções da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e todas as variantes conservadoras dessas sequências. Entende-se, portanto, que a sequência de aminoácido do polipeptídeo da presente invenção é variável.

[0068] Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode ter uma sequência de aminoácido que corresponde à totalidade ou uma parte da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 ou a totalidade ou uma parte de uma variante conservadora da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

[0069] Em um exemplo específico, o polipeptídeo da presente invenção tem a seguinte sequência de aminoácido:

MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRITND
 GRICIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFVPCTRNCRPPGC
 ECVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:5).

[0070] Com 128 aminoácidos, a proteína DIV6728 (SEQ ID NO: 5) é cerca de 14 kD em tamanho e tem um pI teórico de cerca de 6,54. Esta proteína pertence à superfamília TIL, que é um grupo de inibidores da protease serina. Em um esforço para identificar as ferramentas para capturar e detectar nematódeos e/ou antígeno do nematódeo em mamíferos infectados por nematódeo, os presentes inventores determinaram que apenas uma parte truncada (cerca de 7 kDa) da proteína de comprimento inteiro (14 kDa) e, portanto, não a versão 14 kDa, está presente nas fezes de caninos que são infectados por *T. canis*. (Esta parte truncada 7 kDa da DIV6728 é referida aqui como "Copro6728"; a detecção da Copro6728 em fezes de caninos infectados pelo *T. canis* é descrita na seção de exemplo incluída aqui.) Em um aspecto, portan-

to, a presente invenção fornece polipeptídeos que possam ser usados para gerar anticorpos que podem ser usados para especificamente capturar e detectar a Copro6728.

[0071] Os 127 resíduos do aminoácido que seguem o resíduo de metionina N-terminal do polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 5 (DIV6728) especificamente representam os resíduos de aminoácidos 17 a 143 da SEQ ID NO: 3. Conforme descrito na seção de exemplo incluída aqui, a metionina N-terminal foi adicionada artificialmente ao N-terminal desse polipeptídeo através pela realização de uma técnica de clonagem padrão. Também conforme descrito em toda a seção de exemplo, o anticorpo produzido contra o polipeptídeo correspondente a SEQ ID NO: 5 foi útil para detectar antígeno do nematódeo. Porque a metionina N-terminal foi adicionada artificialmente e não imaginava-se existir naturalmente no *Toxocara* (o resíduo que vem imediatamente antes do resíduo de glicina na posição 17 em cada uma das SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4 é a alanina, e não a metionina), é portando contemplado que o polipeptídeo da presente invenção possa ter uma sequência de aminoácido que corresponde de 17 a 143 resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 3, ou, mais especificamente:

GPESCCPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRRTNDG
RCIPASQCPQHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFPCTRNCRPPGCE
CVAGAGFVRDAEGNCIKFDDCPK (SEQ ID NO:6).

[0072] Além disso, um alinhamento da SEQ ID NO: 5 (a maioria sequência derivada do *Toxocara canis*; com a única exceção sendo o resíduo da metionina N-terminal) para a SEQ ID NO: 4 (sequência derivada do *Toxocara cati*) é mostrado na figura 5. Devido ao anticorpo ser produzido contra um polipeptídeo tendo sequência correspondente a SEQ ID NO: 5 foi útil para detectar o *Toxocara cati* (vide seção de exemplo incluída aqui), é contemplado adicionalmente que o polipeptídeo da presente invenção pode ter a sequência de aminoácido correspondente a SEQ ID NO: 7 (que também é mostrada na figura 5), onde

o X na posição 1 está ausente ou M, o X na posição 2 está ausente ou L, o X na posição 3 está ausente ou S, o X na posição 4 está ausente ou V, o X na posição 5 está ausente ou L, o X na posição 6 está ausente ou A, o X na posição 7 está ausente ou L, o X na posição 8 está ausente ou F, o X na posição 9 está ausente ou A, o X na posição 10 está ausente ou L, o X na posição 11 está ausente ou I, o X na posição 12 está ausente ou T, o X na posição 13 está ausente ou F, o X na posição 14 está ausente ou A, o X na posição 15 está ausente ou V, o X na posição 16 é M ou A, o X na posição 17 é G ou D, o X na posição 19 é E ou K, o X na posição 42 é N ou D, o X na posição 66 é N ou D, e o X na posição 132 é E ou A.

[0073] O polipeptídeo da presente invenção pode ter a sequência de aminoácido correspondente a SEQ ID NO: 11, em que o aminoácido na posição 54 é E ou A. Os anticorpos que se ligam especificamente a este polipeptídeo estão incluídos na invenção.

[0074] É também contemplado que uma ou mais da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 07 possa ser apenas uma parte de uma sequência maior de polipeptídeos, e, portanto, pode representar a sequência parcial de um ou mais proteínas que normalmente são expressas em nematódeo, por exemplo, ou uma ou mais sequências de polipeptídeos que são artificialmente fundidas a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 11, ou Copro6728. O versado reconhecerá que há uma variedade de técnicas existentes para fundir artificialmente dois ou mais fragmentos de polipeptídeos juntos.

[0075] É ainda mais contemplado que o polipeptídeo da presente invenção possa incluir mais de uma da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, e SEQ ID NO: 11, ou Copro6728. Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode incluir a SEQ NO: 5 fundida a SEQ ID NO: 7. Além disso, é contem-

plado que o polipeptídeo da presente invenção pode incluir uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 11, ou Copro6728. Por exemplo, o polipeptídeo da presente invenção pode ser formado por uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondente a SEQ ID NO: 5, que se fundem. Em outro exemplo, polipeptídeo da presente invenção pode ser formado por uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondente a SEQ ID NO: 5 e uma pluralidade de fragmentos de polipeptídeos correspondente a SEQ ID NO: 7, que são fundidos juntos em qualquer combinação.

[0076] Considerando que um polipeptídeo particular da presente invenção foi expresso e isolado por uma técnica específica (na qual é descrita na seção de exemplo incluída aqui), o versado reconhecerá que qualquer um dos polipeptídeos da presente invenção pode ser isolado ao empregar uma ou mais de uma variedade de técnicas. (Vide, por exemplo, Sewald e Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley Publishing (2002); *Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology)* Howl, ed., Humana Press (2005); Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press (2002), cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade.) Estas técnicas incluem aquelas que podem ser realizadas para isolar naturalmente polipeptídeos existentes, tais como Copro6728, ou polipeptídeos tendo sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, e SEQ ID NO: 11, e qualquer variante de ocorrência natural desses polipeptídeos. Estas técnicas ainda incluem aquelas que podem ser realizadas para gerar artificialmente os polipeptídeos tendo sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, e SEQ ID NO: 11 e qualquer variante

conservadora desses polipeptídeos. Essas variantes podem ser geradas, por exemplo, ao empregar qualquer uma ou mais técnicas de mutagênese ou por síntese direta.

[0077] Os polipeptídeos da presente invenção são capazes de induzir uma resposta imune em um animal hospedeiro, que é exposta a estes polipeptídeos para produzir um ou mais dos anticorpos da presente invenção. Independentemente da técnica através da qual são obtidos, os polipeptídeos da presente invenção são preferivelmente preparados em forma substancialmente pura quando estão para serem usados para a finalidade de elevar o anticorpo. Preferencialmente, estes polipeptídeos são, pelo menos, cerca de 80% puro, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90 a 95% puro, e ainda mais de preferência pelo menos cerca de 99% puro. As técnicas exemplares para induzir uma resposta imune em um organismo hospedeiro e para isolar os anticorpos deles são descritos aqui, mas é para ser entendido que a presente invenção não se limita a essas técnicas. O versado irá reconhecer que há uma pluralidade de técnicas para atingir esse mesmo objetivo sem se desviar do escopo e do espírito da invenção.

B. Anticorpos da invenção

[0078] A presente invenção ainda inclui fragmentos de ligação de anticorpos e de antígenos dos mesmos, que são produzidos contra e que especificamente liga a totalidade ou parte de um ou mais polipeptídeos da presente invenção, e também inclui composições que incluem os referidos fragmentos de ligação de anticorpos e antígeno dos mesmos. Quando colocado em contato com uma amostra obtida de um mamífero, esses fragmentos de ligação de anticorpos e de antígenos são capazes de se ligarem especificamente ao antígeno do nematódeo na amostra, mas não são capazes de se ligar especificamente a qualquer antígeno do ancilóstomo, tricurídeo, ou dirofilária que pode estar presente na amostra. Os anticorpos da presente invenção são

adequados para serem usados apenas para capturar uma ou mais antígenos do nematódeo, só para detectar um ou mais antígenos do nematódeo, ou mais de preferência, para capturar e detectar um ou mais antígeno do nematódeo.

[0079] Os anticorpos da invenção podem pertencer a qualquer classe de anticorpo, incluindo, por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e podem ser preparados por qualquer variedade de técnicas conhecidas aos versados. (Vide, por exemplo, Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998); Dean, *Methods Mol. Biol.* 32:361-79 (1994); Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994); Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994); Drenckhahn *et al.* *Methods Mol. Biol.* 37:7-56 (1993), Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239 -65 (1992), Wright *et al.* *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992); Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) e *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, e Kaser, eds., CRC Press (2006), cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade).

[0080] Em uma técnica, o polipeptídeo da invenção é introduzido em um animal hospedeiro, como no coelho, camundongo, rato, porquinho-da-índia, cabra, porco, vaca, ovelha, burro, cão, gato, galinha, ou cavalo, por exemplo. Uma resposta imune melhorada pode ser obtida no animal hospedeiro associando o polipeptídeo com um veículo e/ou através da exposição do hospedeiro a um adjuvante, mas é preciso entender que a presente invenção não exigir que o polipeptídeo seja associado com um veículo ou que o hospedeiro seja exposto ao adjuvante. Um veículo exemplar que pode ser usado para esta finalidade é a albumina de soro bovino, tireoglobulina 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 com tal veículo, ou se o hospedeiro está exposto a um adjuvante, imunizações de reforço podem ser feitas

opcionalmente com o animal hospedeiro, sendo sangrado uma ou mais vezes depois disso. Os anticorpos policlonais que ligam especificamente o polipeptídeo podem então ser purificados a partir dos antissoros obtidos do sangramento ou sangramentos. Essa purificação pode ser alcançada, por exemplo, empregando técnicas de cromatografia de afinidade que envolve a associação do polipeptídeo a um suporte sólido. Tais técnicas de cromatografia de afinidade são bem conhecidas pelo versado.

[0081] Em uma modalidade, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em coelhos ao imunizar esse animal hospedeiro com o polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido correspondente a SEQ ID NO: 5 (Doravante aqui, este anticorpo específico é referido como um "anti-DIV6728 pAB".) Uma técnica específica para produzir e isolar o anti-DIV6728 pAB é descrita na seção de exemplo incluída aqui, mas os versados reconhecerão que a produção e o isolamento do anti-DIV6728 pAB, ou qualquer outro anticorpo da presente invenção, não se limita a essa técnica específica.

[0082] Em outra modalidade, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo que é produzido em coelhos pela imunização do animal hospedeiro com um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido correspondente a SEQ ID NO: 11 (Doravante aqui, este anticorpo específico é referido como um "anti-6728C"). Uma técnica específica para produzir e isolar este anticorpo é descrita aqui na seção de exemplo, mas o versado reconhecerá que a produção e o isolamento do anti-Copro6728C não são limitados à técnica específica.

[0083] Em outras modalidades, o anticorpo da presente invenção é produzido em um hospedeiro contra um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácido que é uma variante conservadora da sequência correspondente à SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o anticorpo da presente invenção é produzido em um hospedeiro con-

tra qualquer um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos correspondente à sequência SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, ou SEQ ID NO: 7, ou um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora de uma dessas sequências.

[0084] Em outra modalidade, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo que liga especificamente o Copro6728 e/ou um ou mais dos polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 11, ou porções antigênicas dos mesmos.

[0085] Em ainda outras modalidades, o anticorpo da presente invenção liga especificamente um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora do Copro6728, ou da sequência correspondente a SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 11. Em algumas outras modalidades, o anticorpo da presente invenção liga especificamente um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos correspondente à sequência SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, ou SEQ ID NO: 7, ou um ou mais polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora de qualquer uma dessas sequências.

[0086] Também é preciso entender que os anticorpos da invenção podem ser opcionalmente anticorpos monoclonais ou policlonais, anticorpos de cadeia única (scFv), anticorpos quiméricos, e fragmentos dos mesmos. Os anticorpos monoclonais que são específicos para o polipeptídeo de interesse podem ser obtidos e purificados, por exemplo, através da preparação de linhagens celulares que geram anticorpos com a especificidade desejada para o polipeptídeo de interesse. As linhagens celulares desse tipo podem ser derivadas de células de um tipo específico (por exemplo, células do baço), que são isoladas de um animal hospedeiro que tinha sido previamente imunizado com o

polipeptídeo como descrito anteriormente. Nesse caso, essas células podem então ser imortalizadas, por exemplo, fundindo-as com células de mieloma através da realização de qualquer uma das variedades de técnicas de fusão conhecida pelo versado. Em uma técnica exemplar, as células do animal hospedeiro imunizado são coincubadas com seu parceiro de fusão, por exemplo, as células de mieloma na presença de um detergente por um período curto de tempo antes de serem semeadas em um meio que suporta o crescimento de células híbridas (mas não o parceiro de fusão do mieloma). Tal seleção pode ser alcançada, por exemplo, usando hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Quando as células híbridas surgem durante a seleção, em talvez uma ou duas semanas após o início do processo de seleção, as colônias híbridas únicas (e seus sobrenadantes) são testados quanto à sua capacidade de se ligar ao polipeptídeo ou aos polipeptídeos contra os quais o animal hospedeiro foi imunizado. As colônias híbridas tendo especificidade de ligação mais ideal representariam os melhores candidatos dos quais os anticorpos monoclonais podem ser isolados. Estes anticorpos monoclonais, por exemplo, podem ser isolados diretamente do sobrenadante (isto é, o meio) nos quais essas colônias são cultivadas, empregando qualquer uma das técnicas variadas conhecidas pelo versado.

[0087] Os anticorpos da invenção também podem ser um anticorpo de cadeia única (scFv), ou um fragmento de ligação do antígeno de um anticorpo. Os fragmentos de ligação do antígeno de anticorpos são uma porção de um anticorpo intacto compreendendo o sítio de ligação do antígeno ou região variável de um anticorpo intacto, em que a porção está livre dos domínios constantes da cadeia pesada da região Fc do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ e F_v. Além da produção e purificação de células animais ou de mamíferos, anticorpos, fragmen-

tos de anticorpos, ou suportes sem anticorpos não podem ser selecionadas com base em várias tecnologias *in vitro*, incluindo exposição do fago, exposição ribossomal ou exposição bacteriana.

[0088] Os anticorpos, incluindo anticorpos secundários, podem ser marcados com qualquer tipo de marcador conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, fluorescentes, quimiluminescentes, enzimas, radioativos, partículas coloidais, radioisótopos e marcadores bioluminescentes. Em várias modalidades da invenção, um ou mais dos anticorpos da invenção são marcados com uma enzima, uma partícula coloidal, um radionuclídeo ou um fluoróforo. O marcador particulado pode ser, por exemplo, uma partícula de látex colorido, corante sol, ou sol dourado conjugado a um anticorpo.

C. Métodos, dispositivos e kits da invenção

1. Dispositivos e kits da invenção

[0089] A presente invenção, em um aspecto, é um dispositivo para a detecção de infecção por nematódeo em um mamífero, como um canino, felino, suíno, bovino, humano ou, por exemplo. O dispositivo é organizado para ajudar na detecção da presença ou ausência de antígeno do nematódeo em uma amostra de um mamífero que também pode estar infectado com um ou mais vermes parasitas, incluindo ancilóstomo, tricurídeo, e dirofilária.

[0090] Em um aspecto, os dispositivos incluem um suporte sólido, onde um ou mais anticorpos da invenção são imobilizados em suporte sólido. O suporte sólido pode ser, mas não está limitado a, superfície interna do fundo de um poço de uma placa de microtitulação ou um substrato que está incluído como parte de um dispositivo de fluxo lateral, por exemplo. Uma placa de microtitulação exemplar é uma placa de 96 poços Immulon 1B (que está disponível comercialmente da Thermo Scientific de Milford, MA), mas entende-se que o versado reconhecerá que uma grande variedade de outras placas de microtitula-

ção que não seja a placa de 96 poços Immulon 1B permite a imobilização dos anticorpos nela e, portanto, seria adequada para fornecer o suporte sólido da presente invenção.

[0091] Um dispositivo de fluxo lateral exemplar é o dispositivo de fluxo lateral que é descrito na Patente US nº 5726010, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade. O dispositivo para realizar um ensaio de fluxo lateral pode ser um dispositivo SNAP®, que está disponível comercialmente do IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME. No entanto, entende-se que o versado reconhecerá que uma grande variedade de outros dispositivos de fluxo lateral que não são dispositivos SNAP® ou descritos pela Patente US No. 5726010 permitem a imobilização de um anticorpo neles e, portanto, seriam adequados para serem usados como dispositivo da presente invenção. Estes dispositivos podem incluir, por exemplo, dispositivos de fluxo lateral que usam a tecnologia de ouro coloidal.

[0092] Os anticorpos usados no dispositivo da invenção podem ser imobilizados no suporte sólido por qualquer metodologia conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, covalentemente ou não, direta ou indiretamente, ligando os anticorpos ao suporte sólido. Portanto, enquanto esses anticorpos podem ser ligados ao suporte sólido por adsorção física (ou seja, sem o uso de ligantes químicos), é também verdade que estes anticorpos podem ser imobilizados ao suporte sólido por qualquer método de ligação química (isto é, com o uso de ligantes químicos) conhecido de imediato por um versado na técnica.

[0093] Também é preciso entender que o suporte sólido pode ser qualquer material adequado para a imobilização dos anticorpos da invenção. Por exemplo, o suporte sólido pode ser esferas, partículas, tubos, poços, sondas, fitas, pontas de pipetas, lâminas, fibras, membranas, papéis, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agares, vidro, polipropileno, polietileno, poliestireno, dextrano, náilon,

amilases, plásticos, magnetita ou qualquer outro material adequado prontamente conhecido por um versado na técnica.

[0094] O dispositivo pode incluir opcionalmente um ou mais reagentes de captura do antígeno marcado que pode ser misturado com uma amostra de um mamífero antes de aplicar a um dispositivo da invenção. Quando o reagente de captura do antígeno marcado está incluído, o reagente de captura do antígeno marcado pode ou não ser depositado ou seco em uma superfície sólida do dispositivo. "Reagente de captura do antígeno" refere-se a um composto que é específico para o antígeno ou antígenos de interesse. O reagente de captura do antígeno marcado adicionado à amostra de mamíferos ou pré-depositado no dispositivo, pode ser, por exemplo, um anticorpo marcado específico para um antígeno do nematódeo, incluindo, mas não se limitado a, os anticorpos da presente invenção. Por exemplo, o anti-DIV6728 ou anti-Copro6728 conjugado com peroxidase de rábano silvestre pode ser usado como um reagente de captura do antígeno marcado.

[0095] O dispositivo também pode incluir opcionalmente um reagente líquido que transporte (como quando o dispositivo é um dispositivo SNAP[®], por exemplo), ou facilita a remoção do (como quando o dispositivo inclui uma placa de microtitulação, por exemplo) material solto (por exemplo, porções da amostra de mamíferos que não reagiram, como, por exemplo, porções de extrato fecal que não reagiram, e reagente de captura do antígeno solto) longe da zona de reação (fase sólida). O reagente líquido pode ser um reagente de lavagem e serve apenas para remover o material solto da zona de reação, ou pode incluir um reagente detector e servir tanto para remover o material solto quanto para facilitar a detecção do antígeno. Por exemplo, no caso de um reagente de captura do antígeno conjugado a uma enzima, o reagente detector inclui um substrato que produz um sinal detectável após

reação com o conjugado anticorpo-enzima em uma zona de reação (fase sólida). Alternativamente, no caso de um reagente de captura do antígeno marcado conjugado com uma molécula radioativa, fluorescente, ou absorvente de luz, o reagente líquido atua apenas como uma solução de lavagem facilitando a detecção de formação do complexo na zona reativa lavando reagentes marcados soltos.

[0096] O reagente líquido pode incluir ainda uma quantidade limitada de um "inibidor", isto é, uma substância que bloqueia o desenvolvimento do produto final detectável. Uma quantidade limitada é definida como sendo uma quantidade de inibidor suficiente para bloquear o desenvolvimento do produto final até que a maioria ou todo o material em excesso solto é transportado para longe da segunda região, no momento em que produto final detectável é produzido.

[0097] O dispositivo da presente invenção também pode incluir vários reagentes de ligação imobilizados em locais distintos do reagente ou reagentes de captura do antígeno. Por exemplo, um imunorreagente (um anticorpo, antígeno ou polipeptídeo) que reconhece uma porção do anticorpo específico da espécie (por exemplo, específico do nematódeo) de um anticorpo marcado ou reagente de captura do antígeno, ou uma porção da enzima de um reagente marcado enzimático, pode ser incluído como um controle positivo para avaliar a viabilidade dos reagentes dentro do dispositivo. Por exemplo, um controle positivo pode ser um anticorpo antiperoxidase de rábano silvestre que foi produzido, por exemplo, na cabra ou camundongo. Adicionalmente, um reagente, por exemplo, um anticorpo, isolado de um membro não imune das espécies das quais a porção do anticorpo do complexo antígeno-anticorpo foi obtida pode ser incluído como um controle negativo para avaliar a especificidade da formação imunocomplexa (ou seja, o complexo antígeno-anticorpo).

[0098] Além de ser projetado para detectar nematódeos em uma

amostra de mamífero, o dispositivo da invenção pode ser opcionalmente projetado para permitir um ou mais testes de diagnóstico a ser realizado. Por exemplo, o suporte sólido pode também incluir os reagentes para a detecção de um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, um ou mais vírus, um ou mais fungos, ou uma ou mais bactérias. Os reagentes para a detecção de um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, 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 parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, um ou mais vírus, um ou mais fungos, ou uma ou mais bactérias.

[0099] Em uma modalidade, que é mostrada nas figuras 6A e 6B, o dispositivo da presente invenção é uma placa de microtitulação 10, que inclui uma pluralidade de poços 12, em que cada poço 12 inclui um suporte sólido 14 com anti-DIV6728 pAB (representado como elemento 16) imobilizado neste.

[00100] A placa 10 pode ser usada em conjunto com um método da presente invenção para detectar nematódeo em uma amostra de mamíferos. Especificamente, uma infecção por nematódeo pode ser diagnosticada em um mamífero detectando um ou mais antígenos do nematódeo com o anti-DIV6728 pAB que é imobilizado sobre o suporte sólido 14. Em uma modalidade, os antígenos que são detectados são coproantígenos dos nematódeos. "Coproantígenos dos nematódeos" é qualquer produto ou quaisquer produtos de nematódeo que estão presentes em uma amostra fecal e que podem especificamente e de forma estável se ligar a um anti-DIV6728 pAB ou anti-Copro6728 pAB. Os coproantígenos dos nematódeos, portanto, podem ser nematódeos inteiros, ovos de nematódeos, fragmentos de nematódeos, ou produ-

tos secretados, excretados ou derramados do nematódeo ou uma combinação dos mesmos. Coproantígenos dos nematódeos ainda incluem os polipeptídeos da presente invenção, como Copro6728 e os polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 11, polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácidos que é uma variante conservadora dessas sequências, e/ou fragmentos antigênicos de quaisquer desses polipeptídeos, por exemplo. Um coproantígeno do nematódeo exemplar é o Copro6728 que foi detectado pela presente invenção em amostras fecais obtidas de caninos infectados pelo nematódeo, como descrito aqui.

[00101] A invenção ainda inclui kits de ensaio (por exemplo, artigos de fabricação) para detectar nematódeos em uma amostra de mamíferos. Um kit, portanto, pode incluir um ou mais dispositivos e/ou composições da presente invenção. Por exemplo, o kit pode incluir anticorpos antinematódeos e meios para determinar a ligação dos anticorpos aos antígenos do nematódeo na amostra. Em um exemplo particular, tal kit inclui o dispositivo com um anticorpo antinematódeo imobilizado, como o anti-DIV6728 pAB ou anti-Copro6728 pAB, por exemplo, um ou mais reagentes de captura do antígeno (por exemplo, um reagente de captura do antígeno marcado não imobilizado e um reagente de captura do antígeno imobilizado) e reagente de lavagem, bem como reagente detector e reagentes de controle positivo e negativo, se desejado ou necessário. Outros componentes como tampões, controles e similares, conhecidos por aqueles versados na técnica, podem ser incluídos em tais kits de teste. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas para fornecer as concentrações na solução dos reagentes que aperfeiçoam substancialmente a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos na forma de pó seco, geralmente liofilizado, que, em dissolução fornecerá uma solução rea-

gente com concentrações apropriadas para combinar com uma amostra. O presente kit pode incluir ainda instruções para a realização de um ou mais métodos da presente invenção, incluindo instruções para o uso de qualquer dispositivo e/ou composição da presente invenção que está incluído no kit.

2. Métodos da invenção

[00102] A presente invenção inclui ainda métodos para usar um ou mais dispositivos, kits e/ou composições da presente invenção para detectar a presença ou ausência de nematódeo em uma amostra. Os métodos, portanto, podem ser realizados para detectar a presença ou ausência de nematódeo em uma amostra, como, por exemplo, uma amostra fecal, que é obtida de um mamífero incluindo, mas não se limitado a, um canino, felino, suíno, bovino ou humano. Além disso, os métodos podem ser realizados para detectar *Toxocara*, tais como *T. canis* ou *T. cati*, ou *T. vitulorum*, por exemplo. É para ser entendido, entretanto, que esses métodos não se limitam a ser usados para detectar *Toxocara* e, portanto, esses métodos podem ser realizados com a finalidade de detectar outras espécies de nematódeos como *Toxascaris*, incluindo *T. leonina*, *Baylisascaris*, incluindo *B. procyonis*, *Ascaridia*, incluindo *A. galli*, *Parascaris*, incluindo *P. equorum*, *Ascaris*, incluindo *A. lumbricoides* e de *A. suum*, *Anisakis*, incluindo *Anisakis simplex*, ou *Pseudoterranova*, incluindo *P. decipiens*, por exemplo. Estes métodos ainda são úteis para confirmar tal presença ou ausência de nematódeo em uma amostra, mesmo quando essa amostra inclui um ou mais produtos derivados de espécies de outros vermes, incluindo um ou mais produtos de ancilóstomo, tricurídeo, e/ou dirofílaría.

[00103] Nos métodos da presente invenção, a detecção de nematódeo pode ser realizada pela detecção da presença ou ausência de um ou mais antígenos do nematódeo, como Copro6728 ou os polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácido correspondente à SEQ ID

NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 11, bem como fragmentos antigênicos e/ou variantes conservadoras dessas sequências, por exemplo. Quando a amostra está em teste para nematódeo nas fezes, a porção solúvel das fezes pode ser coletada por qualquer protocolo conhecido na técnica. Por exemplo, além do protocolo específico descrito aqui na seção de Exemplo, as porções solúveis da amostra geralmente podem ser recolhidas através de filtração, extração, centrifugação, ou mistura simples seguida por sedimentação gravimétrica. O versado reconhecerá que há uma variedade de formas de extração e preparação de amostras não fecais de um mamífero também. Por exemplo, a amostra pode ser um fluido corporal que é excretado naturalmente ou liberado pelo mamífero ou que é artificialmente obtida do mamífero. Tal extração artificial pode ser realizada por ordenha do mamífero ou injetando uma seringa no mamífero e extraíndo o fluido para a seringa. Uma vez obtido, o fluido, opcionalmente, pode ser fracionado (por exemplo, o soro pode ser fracionado do sangue total e então usado como amostra). Como outro exemplo, a amostra pode ser obtida esfregando o mamífero, como a cavidade oral do mamífero, por exemplo. Como ainda outro exemplo, cortes de tecidos podem ser obtidos por biópsia.

[00104] Os métodos incluem colocar a amostra de mamífero em contato com um ou mais anticorpos específicos para um ou mais antígenos do nematódeo sob condições que permitam um complexo antígeno/anticorpo, ou seja, um imunocomplexo, se formar. Ou seja, um anticorpo se liga especificamente a um antígeno do nematódeo presente na amostra. O versado é familiar com os ensaios e as condições que podem ser usados para detectar tais complexo de ligação antígeno/anticorpo. Por exemplo, o complexo antígeno/anticorpo pode ser detectado usando um anticorpo secundário que se liga ao complexo antígeno/anticorpo. A formação de um complexo entre o antígeno do

nematódeo e anticorpos antinematódeo na amostra pode ser detectada usando qualquer método adequado conhecido na técnica.

[00105] Além disso, a quantidade relativa de complexos antígeno-anticorpo que são formados em uma reação em particular pode ser medida em relação aqueles formados em qualquer outra reação por qualquer metodologia conhecida na técnica para alcançar esse objetivo. Quando é determinado que uma amostra em teste tem mais complexos antígeno-anticorpo do que uma amostra controle, pode ser concluído que o nematódeo está presente na amostra de teste. Quando isso é verdade, pode ser concluído que o mamífero do qual a amostra foi obtida hospeda uma infecção intestinal por nematódeo. Uma ou ambas as conclusões que o nematódeo está presente na amostra de teste e que o mamífero que está sendo testado hospeda uma infecção intestinal por nematódeo podem ser feitas por um clínico em um provedor de serviços de diagnóstico ou por um cuidador do mamífero, como o veterinário do mamífero, por exemplo. Quando um cuidador de um mamífero determina (ou é informado que) um mamífero hospeda uma infecção por nematódeo, o cuidador pode, então, sujeitar o mamífero a um curso de tratamento que é projetado da melhor forma para livrar o mamífero do nematódeo especificamente, ao invés de uma infecção por nematódeo parasita em geral. Além disso, os seres humanos que possam entrar em contato com o animal infestado ou suas excreções podem ser aconselhados a tomar precauções contra adquirir o parasita. Neste contexto, é importante determinar a espécie de vermes com alta especificidade, pois alguns helmintos tais como nematódeos e ancilóstomos podem causar doenças significativas (por exemplo, larvas migrans, enterite grave, e reações alérgicas) em humanos, embora seja geralmente aceito que o tricurídeo não desempenha um papel zoonótico de importância nos seres humanos. Além disso, a presente invenção pode ser usada para confirmar que qualquer

animal que tenha recebido tratamento para uma infecção por nematódeo tenha sido livrado dessa infecção.

[00106] As etapas do método da presente invenção podem incluir aplicação de uma amostra de mamíferos a um dispositivo da invenção, que inclui um anticorpo específico imobilizado para um ou mais antígenos do nematódeo, e detectar a presença ou ausência do antígeno do nematódeo na amostra. Os anticorpos específicos para antígenos dos nematódeos podem ser direta ou indiretamente ligados a um suporte sólido ou um substrato como um poço de microtitulação, porção imobilizada de anticorpos de um dispositivo SNAP®, grânulo magnético, grânulo não magnético, coluna, matriz, membrana, esteira fibrosa composta de 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 de materiais particulados (por exemplo, vidro ou vários polímeros termoplásticos) ou filme fundido da membrana composto de nitrocelulose, náilon, polissulfona ou similares (geralmente sintéticos na natureza). Todos estes materiais para substratos podem ser usados em formas adequadas, tais como filmes, folhas ou placas, ou podem ser revestidos em ou ligados ou laminados a veículos inertes adequados, tais como papel, vidro, filmes plástico, ou tecidos. Os métodos adequados para imobilizar peptídeos em fases sólidas incluem interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes e similares.

[00107] Os métodos da presente invenção não requerem o uso de fases sólidas ou substratos, no entanto. O versado reconhecerá que há inúmeras maneiras que o presente método pode ser realizado para detectar a presença ou ausência de nematódeo sem envolver o uso de fases sólidas ou substratos. Em apenas um exemplo, métodos de imunoprecipitação que não exijam o uso de fases sólidas ou substratos podem ser realizados.

[00108] Em algumas modalidades da invenção, o complexo antígeno/anticorpo é detectado quando um reagente indicador, tal como uma enzima conjugada, que é ligado 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 indicador/antígeno/anticorpo detectável. Opcionalmente, o anticorpo pode ser marcado com um reagente indicador antes da formação de um complexo antígeno/anticorpo.

[00109] A formação de um complexo antígeno/anticorpo ou um complexo indicador/antígeno/anticorpo em alguns dos métodos da presente invenção especificamente pode ser detectada por separação de tamanho radiométrica, colorimétrica, fluorométrica, fotométrica, ou métodos de precipitação. A detecção de um complexo antígeno/anticorpo também pode ser realizada pela adição de um anticorpo secundário que é acoplado a um reagente indicador incluindo um composto de geração de sinal. Reagentes indicadores incluindo um composto gerador de sinal (marcadores) associado a um complexo polipeptídeo/anticorpo podem ser detectados usando os métodos descritos acima, e podem incluir agentes cromogênicos, catalisadores tais como conjugados de enzimas, compostos fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, compostos quimioluminescente como dioxetanos, acridina, fenantridina, rutênio, e luminol, elementos radioativos, marcadores visuais diretos, bem como cofatores, inibidores, partículas magnéticas, e similares. Exemplos de conjugados de enzima incluem fosfatase alcalina, peroxidase de rábano silvestre, betagalactosidase, e similares. A seleção de um marcador particular, não é crítica, mas será capaz de produzir um sinal por si só ou em conjunto com uma ou mais substâncias.

[00110] Os métodos da invenção incluem, mas não estão limitados

aqueles baseados na reação direta de competição, ou ensaios tipo sanduíche, incluindo, mas não limitado a ELISA, RIA, ensaios de imunofluorescência (IFA), hemaglutinação (HA), imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA), e ensaios de placa microtitulação (isto é, qualquer ensaio feito em um ou mais poços de uma placa de microtitulação). Um ensaio da invenção inclui um ensaio de ligação cromatográfica de fluxo reversível, que pode ser executado, por exemplo, usando um dispositivo SNAP[®]. Vide U.S. Pat. No. 5726010.

[00111] Em algumas modalidades, o método da invenção facilita ensaios de ligação tipo sanduíche ou competição específicos. Em um ensaio tipo sanduíche, os reagentes de captura do antígeno são imobilizados em uma zona reativa. Estes reagentes de captura do antígeno podem se ligar especificamente aos antígenos na amostra sendo testada para nematódeo. Após a ligação do antígeno da amostra, o reagente de captura do antígeno do complexo antígeno/anticorpo é detectado por qualquer método adequado. Por exemplo, o complexo pode ser reagido com reagentes de ligação marcadores específicos (por exemplo, um conjugado anticorpo-enzima) e antígeno detectado (por exemplo, em reação com o substrato).

[00112] Em outras modalidades do método da presente invenção, um ensaio de competição é realizado. Em um ensaio de competição, reagentes de captura de antígeno são imobilizados na zona reativa e são colocados em contato simultaneamente com o antígeno de uma amostra e antígeno marcado (por exemplo, um conjugado antígeno-enzima). A quantidade do marcador detectado na zona reativa é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra.

[00113] Em algumas modalidades do método, os anticorpos específicos para um antígeno ou antígenos do nematódeo são ligados a uma fase sólida ou substrato. Uma amostra potencialmente incluindo um antígeno do nematódeo é adicionada ao substrato. Os anticorpos que

se ligam especificamente aos nematódeos são adicionados. Os anticorpos podem ser os mesmos anticorpos usados na fase sólida ou podem ser de uma fonte diferente ou espécie. Além disso, esses anticorpos podem ser ligados a um reagente indicador, como um conjugado enzimático. As etapas de lavagem podem ser realizadas antes de cada adição. Um cromóforo ou substrato da enzima pode ser adicionado e a cor pode ser deixada para se desenvolver. A reação da cor pode ser interrompida e a cor pode ser quantificada usando, por exemplo, um espectrofotômetro, e/ ou a cor pode ser subjetivamente avaliada pelo olho humano.

[00114] Em outras modalidades do método, os anticorpos específicos para um antígeno ou antígenos do nematódeo são ligados a uma fase sólida ou substrato. Uma amostra potencialmente incluindo um antígeno do nematódeo é adicionada ao substrato. Os segundos anticorpos antiespécies que se ligam especificamente aos antígenos do nematódeo são adicionados. Estes segundos anticorpos são de uma espécie diferente do que são os anticorpos de fase sólida. Os terceiros anticorpos antiespécies que se ligam especificamente aos segundos anticorpos e que não se ligam especificamente aos anticorpos de fase sólida são adicionados. Os terceiros anticorpos podem incluir um reagente indicador, como um conjugado enzimático. As etapas de lavagem podem ser realizadas antes de cada adição. Um cromóforo ou substrato da enzima pode ser acrescentado e cores podem ser deixadas para se desenvolver. A reação da cor pode ser interrompida e a cor pode ser quantificada usando, por exemplo, um espectrofotômetro, e/ou a cor pode ser subjetivamente avaliada pelo olho humano.

[00115] Em um exemplo específico, o método da presente invenção é realizado em conjunto com um dispositivo que é um dispositivo de ensaio de fluxo lateral, adicionando uma amostra preparada de mamíferos a uma matriz de fluxo do dispositivo em uma primeira região

(uma zona de aplicação da amostra). A amostra preparada é realizada em uma via de fluxo de fluido por ação capilar para uma segunda região da matriz de fluxo, onde um marcador particulado capaz de se ligar e formar um primeiro complexo com um antígeno na amostra existe. O rótulo particulado pode ser, por exemplo, uma partícula de látex colorida, corante sol, ou sol dourado conjugado a um anticorpo específico para um antígeno do nematódeo. O primeiro complexo é transportado para uma terceira região da matriz de fluxo onde um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno do nematódeo é 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 pelo olho humano.

[00116] O anticorpo do nematódeo pode ser um reagente de captura do antígeno imobilizado em uma zona de reação (fase sólida). Um segundo reagente de captura do antígeno, ou seja, um segundo anticorpo do nematódeo que foi conjugado com um marcador, pode ser adicionado à amostra antes que a amostra ser adicionada ao dispositivo, ou o segundo reagente de captura do antígeno pode ser incorporado ao dispositivo. Por exemplo, o reagente de captura do antígeno marcado pode ser depositado e seco em uma via de fluxo de fluido que fornece comunicação de fluido entre uma zona de aplicação da amostra e da fase sólida. Contatar o reagente de captura do antígeno marcado com a amostra de teste pode resultar em dissolução do reagente de captura do antígeno marcado.

[00117] Em uma modalidade do método da presente invenção, o antígeno do nematódeo é detectado por ELISA. Exemplos específicos do método ELISA da presente invenção são descritos na seção de exemplo incluída aqui. Embora a presente invenção seja descrita em relação a esses métodos ELISA específicos, no entanto, é para ser

entendido que aqueles versados na técnica reconhecerão que etapas alternativas, adicionais ou de substituição de ELISA podem ser usadas sem se desviar do objetivo básico obtido através deste método da invenção.

[00118] Em outra modalidade da presente invenção, o antígeno do nematódeo é detectado usando um dispositivo de fluxo lateral, tal como um dispositivo SNAP[®], por exemplo.

[00119] Além disso, os métodos da invenção para a detecção de infecção por nematódeo podem ser combinados com outros ensaios de diagnóstico para detectar a presença de outros organismos ou condições. Por exemplo, os ensaios da invenção podem ser combinados com reagentes que detectam um ou mais parasitas fecais de vermes não nematódeos, uma ou mais parasitas fecais sem ser de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, uma ou mais bactérias, um ou mais parasitas transmitidos pelo sangue ou ocultos pelo sangue ou uma combinação dos mesmos. Ao fornecer dois ou mais sítios de ligação únicos em um dispositivo de ensaio único (tais como, por exemplo, dois pontos únicos em um dispositivo de ensaio SNAP[®]), a presente invenção permite a detecção de dois ou mais organismos de uma única amostra. Em uma modalidade, há três pontos exclusivos para detecção de infecção ou infestação passada ou presente de três organismos (os pontos sendo os reagentes de ligação do antígeno ou anticorpo) de uma única amostra (ou seja, a mesma amostra individual é exposta aos três reagentes de captura em um único dispositivo). Em ainda outra modalidade, há quatro locais únicos para a detecção de infecção ou infestação passada ou presente de quatro organismos (os pontos sendo os reagentes de ligação do antígeno ou anticorpo) de uma única amostra (ou seja, a mesma amostra individual é exposta aos quatro reagentes de captura em um único dispositivo). Deve ser entendido, entretanto, que o mesmo dispositivo pode incluir mais de

quatro pontos únicos e/ou permitir a detecção de mais de quatro organismos.

[00120] Os reagentes para a detecção de um ou mais parasitas de vermes não nematódeos, uma ou mais parasitas sem ser de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, uma ou mais bactérias pode ser, por exemplo, um ou mais anticorpos ou um ou mais antígenos reconhecidos por anticorpos específicos para um ou mais parasitas de vermes não nematódeos, uma ou mais parasitas sem ser de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, uma ou mais bactérias.

[00121] Quando um dispositivo da presente invenção inclui reagentes para a detecção específica de ancilóstomo e reagentes para a detecção específica do tricurídeo, por exemplo, além de os reagentes para a detecção de nematódeo, o método da presente invenção pode envolver usar aquele dispositivo para a finalidade adicional ou para fins de determinar se a amostra que está sendo testada para nematódeo também inclui ancilóstomos e/ou tricurídeos. Nessa organização, portanto, o método/dispositivo da presente invenção não seria apenas capaz de confirmar especificamente que o nematódeo está presente ou ausente de uma amostra de teste específica, mas seria também útil para especificamente confirmar que a amostra inclui ou não qualquer antígeno do ancilóstomo e/ou qualquer antígeno do tricurídeo. A capacidade de detectar especificamente o nematódeo e um ou mais organismos aplicando uma única amostra ao dispositivo da invenção seria útil para o cuidador do animal do qual a amostra em teste foi obtida. Um cuidador que descobre que uma amostra inclui tanto o nematódeo quanto o tricurídeo, mas não o ancilóstomo, por exemplo, poderia usar esse conhecimento para tratar o mamífero do qual a amostra foi tomada especificamente para o nematódeo administrando a esse mamífero um fármaco plenamente eficaz contra o nematódeo e um segundo fármaco idealmente eficaz contra o tricurídeo. Ausente de tal conheci-

mento, o cuidador pode, por exemplo, tratar o mamífero com um fármaco que é idealmente eficaz contra o nematódeo apenas, o tricurídeo apenas, ou nenhum nematódeo nem nenhum tricurídeo (nesses casos, o mamífero estaria em risco de receber tratamento subideal). Além disso, os seres humanos que possam entrar em contato com o animal infestado ou suas excreções podem ser aconselhados a tomar precauções contra a aquisição do parasita ou parasitas. Neste contexto, é importante determinar as espécies de vermes com alta especificidade, como alguns helmintos, como nematódeos e ancilóstomos, podem causar doença significativa (por exemplo, larvas migrantes) em humanos, embora seja geralmente aceito que tricurídeos não desempenham um papel de importância zoonótica em humanos.

[00122] O método ainda pode, opcionalmente, incluir usando um ou mais ácidos nucleicos do nematódeo, incluindo, mas não se limitado a, os ácidos nucleicos da presente invenção, para determinar a presença ou ausência de nematódeo em uma amostra de mamíferos. Esse uso desses ácidos nucleicos para determinar a presença de nematódeos pode ser realizado antes, após ou concomitantemente com a realização de quaisquer outros aspectos do método, incluindo a detecção de anticorpos do nematódeo. Portanto, em um aspecto, depois que o nematódeo é detectado ou não em uma determinada amostra e o mamífero do qual a amostra foi obtida é diagnosticado como tendo ou não uma infecção por nematódeo, a amostra (ou uma amostra obtida mais tarde do mamífero diagnosticado) pode ser testada para a presença ou ausência de um ou mais dos ácidos nucleicos, incluindo um ou mais ácidos nucleicos da invenção. Qualquer um errando na detecção do nematódeo em um determinado mamífero usando um ou mais ácidos nucleicos (após o nematódeo ser detectado usando um ou mais anticorpos) precisaria levar em consideração a possibilidade de que os anticorpos haviam detectado o antígeno do nematódeo antes do apa-

recimento do ácido nucleico do nematódeo detectável na amostra. Em tal caso, o cuidador do mamífero pode optar por ignorar a observação de que o ácido nucleico tinha falhado em detectar o nematódeo e proceder com o tratamento dos mamíferos especificamente para a infecção por nematódeo com base na observação de que os anticorpos tinham, de fato, detectado nematódeos. Em outro aspecto, os ácidos nucleicos são usados para determinar a presença ou ausência de nematódeo em um determinado mamífero, e, em seguida, a presença ou ausência de nematódeo é novamente avaliada usando os anticorpos da presente invenção. A detecção de um ou mais ácidos nucleicos do nematódeo pode ser realizada usando todas as técnicas de detecção de ácido nucleico conhecidas pelo versado. Por exemplo, essa detecção pode ser realizada através de uma técnica baseada em PCR como, mas limitado a, por exemplo, técnica baseado em PCR em tempo real. As técnicas exemplares baseadas em PCR estão descritas, por exemplo, em *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 2ª ed. Bartlett, e Stirling, eds, Human Press (2003), e Sambrook e Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), cada um do qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[00123] A presente invenção é descrita especificamente com referência a seis exemplos; no entanto, não é para ser interpretada como sendo limitada a eles.

EXEMPLOS

[00124] Salvo indicação em contrário, os seguintes materiais e técnicas foram usados para gerar dados descritos em um ou mais dos exemplos de 1 a 8, conforme descrito abaixo.

[00125] Preparação de anticorpo policlonal. O anticorpo policlonal "anti- DIV6728 pAB " (IgG) foi produzido em coelho contra um polipeptídeo tendo sequência de aminoácidos correspondente a SEQ ID NO:

5 e purificado a partir do soro usando métodos padrão. Resumidamente, os nucleotídeos 76 a 456 da SEQ ID NO: 1 foram clonados "in-frame" em um vetor (D8223, que é um derivado do pUC19) para criar o D8245 plasmídeo. Especificamente, os 125 aminoácidos da SEQ ID NO: 5 que seguem o resíduo de metionina no N-terminal dessa sequência corresponde a uma porção de SEQ ID NO: 3 e são codificados pela parte clonada da SEQ ID NO: 1. No plasmídeo D8245, o resíduo de metionina N-terminal foi codificado pela sequência do vetor na junção daquele plasmídeo onde o vetor foi ligado à sequência clonada da SEQ ID NO: 1.

[00126] A sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 5 foi então clivada a partir do plasmídeo D8245 por digestão de restrição exonuclease (NdeI e BamHI) e purificada. Esta sequência purificada foi então ligada ao vetor de expressão linearizado, pET28a, e a construção circular consequente (pTDX198:: DIV6728) foi transformada em células *E. coli* BL21 (DE3) (A sequência completa da inserção foi confirmada por análise de sequência de DNA). Expressão da proteína de fusão marcada com His foi induzida pela adição de 1 mM IPTG para as culturas de *E. coli* transformada. A proteína recombinante foi solubilizada em 6 M de ureia e purificada por afinidade de níquel e cromatografia de troca iônica (esta proteína recombinante é referida aqui como "rDIV6728").

[00127] Depois que o rDIV6728 foi introduzido nos coelhos, o anti-DIV6728 pAB foi purificado do plasma dos coelhos imunizados isolando anticorpos IgG por cromatografia de afinidade da proteína G. A proteína-G purificada do anticorpo policlonal anti-DIV6728 pAB foi usada em todos os exemplos descritos aqui, exceto pelo exemplo 3 (figuras 10A e 10B), onde o anti-DIV6728 PAB utilizado foi purificado por afinidade com rDIV6728 proteína.

[00128] Infecção e tratamento anti-helmíntico de animais caninos e

felinos. A infecção por nematódeos parasitários foi realizada por administração oral de cerca de 150 a 300 ovos larvados de um nematódeo (*Toxocara*), ancilóstomo (*Ancylostoma canium*), ou tricurídeo (*Trichuris vulpis*) a um canino ou felino saudável (especificamente, o *T. canis* foi o nematódeo administrado ao canino e o *T. cati* foi o nematódeo administrado a felinos). Para os exemplos 1 e 2, as amostras fecais foram coletadas de caninos conhecidos por serem naturalmente infectados com dirofilária (*Dirofilaria immitis*). Além disso, para os exemplos 4 e 6 apenas, os caninos foram tratados no dia 91 após a infecção com Interceptor® (*milbemicina oxima*), que é um agente anti-helmíntico comercialmente disponível do Novartis Animal Health Inc. da Basileia, Suíça, ou os felinos foram tratados no dia 56 após a infecção com Drontal® (praziquantel/ pamoato de pirantel), que é um agente anti-helmíntico disponível comercialmente da Bayer HealthCare, LLC da Shawnee Mission, KS, de acordo com o protocolo do fabricante. É bem sabido pelos versados na técnica que o Interceptor® e o Drontal® são eficazes para a eliminação dos nematódeos (e outros vermes parasitários) de caninos e felinos, respectivamente, dentro de 72 horas após o tratamento. A infecção foi confirmada por observação microscópica de ovos do verme em amostras fecais obtidas desses animais hospedeiros.

[00129] Preparação da amostra fecal canina e felina. Animais caninos e felinos conhecidos por estarem livres de infecção por verme parasitário ou de serem infectados com um dos nematódeos, ancilóstomo, tricurídeo, ou dirofilária fornece fonte de amostras fecais. As amostras (aproximadamente 1 grama) de amostras fecais caninas ou felinas sem conservantes congeladas foram suspensas em 4 ml de solução diluente ("solução diluente" é 0,05 M de Tris base; 1 mM de EDTA; 0,45% de Kathon; 16 mg/ml de sulfato de gentamicina, 0,05% de Tween-20, 40% de soro bovino fetal, 10% de soro de coelho e 5% de

soro de camundongo). A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos para produzir um primeiro sobrenadante. O primeiro sobrenadante foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos para produzir um segundo sobrenadante, que é aqui referida como "extrato fecal".

[00130] Ensaio ELISA. Anti-DIV6728 pAB purificado (100 µl/poço; 3 µg/ml para os exemplos 2, 4 e 6; 10 µg/ml para os exemplos 1 e 5) foi imobilizado por adsorção física em placas de 96 poços Immulon 1B durante a noite a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 1% BSA em 0,1 M de Tris pH 7,0 a 4°C durante a noite, seguido de secagem em temperatura ambiente. Aproximadamente 100 µl de extrato fecal foram adicionados a cada poço e permitidos incubar em temperatura ambiente por uma hora. Os poços foram então lavados cinco vezes com uma solução de PBS-Tween-20 de acordo com métodos padrão conhecidos por aqueles versados na técnica. Em um recipiente de reação separada, o anti-DIV6728 pAB livre foi marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) usando o agente de ligação cruzada 4-[N-maleimidometil]ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC) para criar um conjugado, e este conjugado (3 µg/ml para os exemplos 2, 4 e 6; 7,5 µg/ml dos exemplos 1 e 5) foi adicionado a cada poço tendo imobilizado o anti-DIV6728 pAB. Após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, o conjugado livre foi lavado dos poços usando solução de PBS-Tween-20 de acordo com métodos padrão conhecidos para aqueles versados na 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. Depois de parar cada reação enzimática com 0,1% de dodecil sulfato de sódio a de (SDS), após o período de incubação de 10 minutos, o valor de densidade óptica (OD) de cada poço da placa de 96 poços foi medido a A650 por técnicas de espectrofotometria padrão usando uma placa

leitora ELISA para gerar um "valor OD650" (ou, mais simplesmente, um "valor OD") para cada poço. Nesta combinação, o valor de OD obtido por qualquer poço em particular da placa de 96 poços foi diretamente proporcional à quantidade de antígeno especificamente ligado presente no poço.

EXEMPLO 1

[00131] O anti-DIV6728 pAB se liga especificamente aos coproantígenos do nematódeo, mas não se liga especificamente aos coproantígenos do ancilóstomo, tricurídeo, ou dirofilária.

[00132] Foi um objetivo do exemplo 1 determinar se o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao coproantígeno do nematódeo em caninos. Os valores OD medidos para extratos de fezes caninas agrupados são mostrados na figura 7. Especificamente, esses extratos fecais foram provenientes de amostras fecais obtidas de cinco animais caninos conhecidos estarem infectados com nematódeo ("infectado por nematódeo"), dois animais caninos conhecidos estarem infectados com ancilóstomo ("infectado por ancilóstomo"), e cinco animais caninos sabidos estarem infectados com tricurídeo ("infectados por tricurídeo"). Além disso, os valores de OD foram também medidos para extrato de *Toxocara canis* inteiro ("*Toxocara* inteiro"; 1µg/ml), que serviu como controle positivo, e para uma amostra agrupada de extratos fecais foram obtidas de cinco caninos conhecidos por serem livres de infecção por vermes parasitários ("não infectados") e para uma amostra que não continha qualquer extrato fecal ("apenas diluente"). (Estas duas últimas amostras serviram como controles negativos).

[00133] Referindo-se à figura 7, o valor do OD medido para a amostra única de diluente de controle negativo foi de 0,23 e a amostra não infectada de controle negativo foi de 0,21.

[00134] Por outro lado, o valor de OD medido do extrato fecal agrupado dos caninos infectados por nematódeo foi de 2,62, que foi mais

de 11 vezes maior do que os valores de OD, que foram obtidos para as amostras de controle negativo. Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente a um ou mais coproantígenos do nematódeo.

[00135] Foi um segundo objetivo do exemplo 1 determinar se o anti-DIV6728 pAB liga especificamente o coproantígeno do ancilóstomo e/ou tricurídeo. Referindo-se à figura 7, os valores OD medidos para as amostras infectadas por ancilóstomos e tricurídeos foram de 0,21 e 0,14, respectivamente, que foram aproximados ou inferiores aos valores OD medidos da amostra única de diluente de controle negativo (0,23) e a amostra não infectada do controle negativo (0,21), e foram cerca de 12 e cerca de 18 vezes menor (respectivamente) que o valor OD medido da amostra do nematódeo (2,62). Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB não liga especificamente o coproantígeno em qualquer uma das amostras obtidas de caninos infectados por ancilóstomos e tricurídeos.

[00136] Foi um terceiro objetivo do exemplo 1 determinar se o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao coproantígeno da dirofilária em caninos. Os valores de OD medidos para extratos fecais canino individuais são mostrados na figura 8. Especificamente, estas amostras foram obtidas de caninos infectados por dirofilária que são identificadas como "TRS 405", "TRS 583" e "TRS 868" na figura 8. Além disso, um valor de OD também foi medido para cada um dos dois extratos fecais obtidos a partir de dois caninos que não têm infecção por verme parasitário ("negTIY" e "negLCZ"). (Esses dois últimos extratos serviram como controles negativos).

[00137] Referindo-se à figura 8, os valores de OD medidos para amostras infectadas por dirofilária foi de 0,25 para o canino TRS 405 e foi de 0,27 para cada um dos caninos TRS 583 e TRS 868. Estes valores aproximaram os valores de OD medidos para as amostras de con-

trole negativo (0,21 e 0,23), e foram cerca de 10 vezes inferiores ao valor de OD medido da amostra do nematódeo (2,62). Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB não se ligam especificamente a qualquer coproantígeno nas amostras obtidas de caninos infectados por dirofilária.

EXEMPLO 2

[00138] Quando testado por ELISA em um formato de placa de microtitulação, o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao coproantígeno do nematódeo, mas não se liga especificamente o coproantígeno ao ancilóstomo, tricurídeo, ou dirofilária, e a ligação específica do coproantígeno do nematódeo pelo anti-DIV6728 pAB produz uma mudança colorimétrica, que é facilmente observável a olho nu.

[00139] Foi um objetivo do exemplo 2 determinar se a ligação específica entre o anti-DIV6728 pAB e o coproantígeno do nematódeo, enquanto o anti-DIV6728 pAB é imobilizado em um suporte sólido, pode produzir uma mudança colorimétrica que é observável a olho nu.

[00140] Referindo-se à figura 9, o anti-DIV6728 pAB (3 µg/ml) foi imobilizado nas superfícies do fundo dos poços A1 a A12 e B1 a B12 de uma placa de microtitulação como descrito anteriormente. Após tal imobilização, os poços A3 e B3 foram expostos ao extrato fecal de um canino infectado por dirofilária (indicado por "HW" na figura 9). Os poços A4 e B4 foram expostos ao extrato fecal de um primeiro canino infectado por ancilóstomo, os poços A5 e B5 foram expostos ao extrato fecal de um segundo canino infectado por ancilóstomo, e os poços A6 e B6 foram expostos ao extrato fecal de um terceiro canino infectado por ancilóstomo. Os poços A7 e B7 foram expostos ao extrato fecal de um primeiro canino infectado por nematódeo, os poços A8 e B8 foram expostos ao extrato fecal do segundo canino infectado por nematódeo, e os poços A9 e B9 foram expostos ao extrato fecal de um terceiro canino infectado por nematódeo. Os poços A10 e B10 foram

expostos ao extrato fecal de um primeiro canino infectado por tricurídeo, os poços A11 e B11 foram expostos a extrato fecal de um segundo canino infectado por tricurídeo, e os poços A12 e B12 foram expostos ao extrato fecal de um terceiro canino infectado por tricurídeo. Os poços A1 e B1 foram expostos ao rDIV6728 (1 µg/ml), e, portanto, aqueles poços serviram como controle positivo. Os poços A2 e B2 não foram expostos a qualquer extrato fecal ou ao rDIV6728 e, portanto, aqueles poços serviram como controle negativo. Após a lavagem, todos os poços foram expostos ao rDIV6728 pAB marcado com HRP em 3 µg/ml, como descrito acima.

[00141] Após a incubação de todos esses poços com substrato de peroxidase TMBLUE® e adição posterior de SDS, a mudança colorimétrica foi visualmente observada em cada um dos poços que haviam sido expostos com extrato fecal de caninos infectados por nematódeos (A7 a A9 e B7 a B9), mas nenhuma mudança colorimétrica foi observada em qualquer um dos poços que haviam sido expostos ao extrato fecal de caninos infectados com ancilóstomo, tricurídeo ou dirofilária.

[00142] Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB detecta o nematódeo em um formato ELISA bastante suficiente para produzir uma mudança colorimétrica, que é robusta e facilmente visível ao olho humano. Além disso, estes dados indicam que tal mudança colorimétrica permite que o olho humano facilmente distinga amostras fecais positivas de nematódeos daqueles que não contenham nematódeos, incluindo aquelas que incluem um ou mais dos ancilóstomos, tricurídeos, ou dirofilárias.

EXEMPLO 3

[00143] Quando testados por ELISA em um formato de fluxo lateral, o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao coproantígeno do nematódeo e esta ligação específica do coproantígeno do nematódeo pelo anti-DIV6728 pAB produz uma mudança colorimétrica que é fa-

cilmente observável a olho nu.

[00144] Foi um objetivo do exemplo 3 determinar se o anti-DIV6728 pAB pode ser usado para capturar e detectar coproantígeno do nematódeo em um fluxo lateral ELISA. O formato de fluxo lateral usado foi um dispositivo de ensaio SNAP[®], similar ao que está descrito na Patente U.S. nº 5726010. Além disso, o ensaio foi realizado geralmente conforme descrito na mesma patente. Resumidamente, entre outros componentes, o dispositivo de ensaio SNAP[®] incluiu um copo de entrada de amostra, um fluxo de matriz, um suporte pré-filtrado de amostra para remover material particulado interferente, um suporte de reagente de ligação específico, uma zona reativa, e um reservatório absorvente. O anti-DIV6728 pAB foi imobilizado na forma de uma mancha pequena e redonda, na zona reativa por secagem (este anti-DIV6728 pAB ligado é referido aqui, neste exemplo apenas, como a "reagente de captura"). A zona reativa foi em seguida bloqueada com BSA. Um extrato fecal agrupado (150 µL) de caninos infectados por nematódeo foi misturado com 200 µL (1,0 µg/ml) de conjugado anti-DIV6728 pAB (o anti-DIV6728 pAB foi purificado por afinidade, antes de ser marcado com HRP, tal como descrito acima; este anti-DIV6728 pAB conjugado é referido aqui, neste exemplo apenas, como "reagente de detecção"). Esta mistura foi adicionada ao copo de amostra e, em seguida, foi permitida a fluir ao longo da matriz de fluxo. Enquanto na matriz de fluxo, o reagente de detecção se liga especificamente aos coproantígenos dos nematódeos presentes no extrato fecal. Os complexos resultantes (ou seja, aqueles que incluíram o reagente de detecção e o coproantígeno do nematódeo) foram permitidos a se ligarem especificamente ao reagente de captura imobilizado na zona de reação. Fluir ao longo do fluxo da matriz foi revertido por contatar o reservatório absorvente com a matriz de fluxo. Neste momento, o detector e a solução de lavagem migraram para a matriz de fluxo para

remover quaisquer componentes livres e para permitir a detecção de quaisquer complexos de analitos que estavam presentes, em que o reagente de captura foi imobilizado na zona de reação. (Esta etapa de detecção durou cerca de oito minutos.) A interrupção da detecção dos complexos de analitos ocorreu expondo os complexos de analitos de 0,1% de azida.

[00145] Como mostrado na figura 10A, a detecção dos complexos de analitos em que o reagente de captura foi imobilizado na zona de reação foi visivelmente aparente (vide mancha escura indicada pela seta). Em uma amostra de controle negativo mostrada na figura 10B, nenhum complexo de analito foi detectado em que o reagente de captura foi imobilizado na zona de reação de um dispositivo separado. (O ensaio de controle negativo foi realizado exatamente como o ensaio de detecção do nematódeo, com uma exceção, que foi o extrato fecal que foi usado no controle negativo foi obtido de um canino que não hospedava uma infecção por nematódeo.) Estes dados, portanto, indicam que o anti-DIV6728 pAB pode ser usado em um formato ELISA de fluxo lateral para se ligar especificamente ao coproantígeno do nematódeo. Esta ligação específica é facilmente visível ao olho humano.

EXEMPLO 4

[00146] O anti-DIV6728 pAB não detecta o nematódeo em fezes de animais caninos que tiveram uma infecção por nematódeo, mas que está livre desta infecção no momento em que as fezes foram excretadas pelos caninos.

[00147] Foi um objetivo do exemplo 4 determinar se o anti-DIV6728 pAB detecta nematódeos nas fezes de animais caninos que estavam livres de uma infecção anterior por nematódeo. Os valores de OD medidos para amostras fecais foram obtidos de um primeiro conjunto de cinco caninos e um segundo conjunto de cinco caninos são mostrados na figura 11 e 12, respectivamente. O primeiro conjunto de caninos,

que é identificado como "QKZ", "RYZ", "KWZ", "SPY" e "WHY", foi infectado com nematódeo no dia 0 e foi tratado com o agente anti-helmíntico Interceptor[®] no dia 91 após a administração da infecção como descrita anteriormente. As amostras fecais foram colhidas de todos ou alguns do primeiro conjunto de caninos no dia 0, no dia 2 e no dia 111 após a administração de infecções por nematódeo a estes animais, e em dias selecionados entre o dia 2 e dia 111. A observação microscópica das amostras fecais do primeiro conjunto de caninos confirmou que cada uma das amostras colhidas no dia 0 ao dia 31 e no dia 100 ao dia 111 foi praticamente isenta de ovos de nematódeo, e que, com uma exceção, esses ovos estavam presentes apenas nas amostras em cada um dos dias 38 ao 97. (A única exceção sendo que os ovos não foram observados na amostra fecal do dia 38 do canino KWZ).

[00148] O segundo conjunto de caninos, que é referido como "LCZ", "SBY", "RCZ", "SVY" e "TIY", nunca foi infectado com nematódeos (e, portanto, este segundo conjunto de caninos serviu como controle negativo). As amostras fecais foram colhidas de cada um destes caninos no dia que o primeiro conjunto de caninos foi infectado com nematódeo (dia 0). Além disso, a amostra fecal foi colhida deste segundo conjunto de caninos no dia 2 e no dia 107 após a administração de infecções por nematódeo para o primeiro conjunto de caninos, e em dias selecionados entre o dia 2 e o dia 107. A observação microscópica das amostras fecais do segundo conjunto de caninos confirmou que cada uma das amostras colhidas no dia 0 ao dia 107 dias estava livre de ovos de nematódeo.

[00149] Referindo-se à figura 11, os valores de OD medidos para as amostras fecais colhidas do primeiro conjunto de caninos (ou seja, os caninos que foram infectados com o nematódeo) no dia 38 ao dia 93 foram muitas vezes maiores do que os valores de OD medidos para as

amostras fecais desses mesmos caninos após seu tratamento com o agente anti-helmíntico. Além disso, os valores de OD medidos para as amostras fecais colhidas do primeiro conjunto de caninos no dia 38 ao dia 93 foram muitas vezes maiores do que para cada uma das amostras de controle negativo da figura 12. Estes dados indicam ainda que o anti-DIV6728 pAB não detecta o nematódeo em fezes de um canino que está livre de uma infecção anterior por nematódeo.

EXEMPLO 5

[00150] O anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao antígeno do nematódeo em amostras fecais provenientes de animais felinos infectados por nematódeo.

[00151] Foi um objetivo do exemplo 5 determinar se o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente ao coproantígeno do nematódeo em felinos. Os valores de OD medidos para amostras fecais obtidas de felinos não infectados e felinos infectados por nematódeo são mostrados na figura 13. Especificamente, esses valores de OD foram medidos a partir de amostras fecais coletadas de cinco felinos diferentes infectados por nematódeo (representado pelos identificadores "C85" "C87", "C96", "C100" e "C104") 40 dias após a administração de uma infecção por nematódeo para esses felinos. Como um controle negativo, os valores de OD também foram medidos a partir de uma amostra fecal obtida do felino C85 um dia antes da administração da infecção por nematódeo para este felino ("dia -1").

[00152] Referindo-se à figura 13, o valor de OD medido para os felinos não infectados (C85 no dia -1) foi de 0,06. Os valores de OD dos cinco felinos no dia 40 variaram de cerca de três vezes (o valor de OD do felino C85 no dia 40 foi de 0,16) para mais de 30 vezes (o valor de OD do felino C96 foi de 1,98) maior do que o valor de OD medido para o felino não infectado. Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB se liga especificamente a um ou mais coproantígenos do nematódeo

em felinos.

EXEMPLO 6

[00153] O Anti-DIV6728 pAB não detecta nematódeo em fezes de animais felinos que tiveram uma infecção por nematódeo, mas que se livraram dessa infecção no momento em que as fezes foram excretadas pelos felinos.

[00154] Foi um objetivo do exemplo 6 determinar se o anti-DIV6728 pAB detecta nematódeos nas fezes de animais felinos que se livraram de uma infecção anterior por nematódeo. Os valores de OD medidos para as amostras fecais foram obtidas a partir de um primeiro conjunto de seis felinos e um segundo conjunto de seis felinos são mostrados na figura 14 e 15, respectivamente. O primeiro conjunto de felinos, que é identificado como "C96", "C100", "C107", "C85", "C87" e "C104", foi infectado com o nematódeo no dia 0 e foi tratado com o agente anti-helmíntico Drontal® no dia 56 após a administração de uma infecção como descrita anteriormente. As amostras fecais foram colhidas de todos ou alguns do primeiro conjunto de felinos no dia 0, no dia 1 e no dia 77 após a administração da infecção por nematódeo a estes animais, e em dias selecionados entre o dia 1 e o dia 77. A observação microscópica das amostras fecais do primeiro conjunto de felinos confirmou que cada uma das amostras colhidas no dia 0 ao dia 26 e no dia 60 ao dia 77 estava substancialmente livre de ovos de nematódeo, e que esses ovos estavam presentes em cada uma das amostras do dia 34 ao dia 54.

[00155] O segundo conjunto de felinos, que são identificados como "C91", "C97", "C106", "C81", "C98" e "C118", nunca foi infectado com o nematódeo (e, portanto, serviu como controle negativo). As amostras fecais foram colhidas de cada um desses felinos no dia em que o primeiro conjunto de felinos foi infectado com o nematódeo (dia 0). Além disso, amostras fecais foram colhidas deste segundo conjunto de feli-

nos no dia 74 seguido de administração de infecções por nematódeo para o primeiro conjunto de felinos, e em dias selecionados entre o dia 1 e o dia 74. A observação microscópica das amostras fecais do segundo conjunto de felinos confirmou que cada uma das amostras colhidas no dia 0 ao dia 74 estava livre de ovos de nematódeo.

[00156] Referindo-se à figura 14, os valores de OD medidos para várias das amostras fecais colhidas do primeiro conjunto de felinos (isto é, os felinos que estavam infectados com o nematódeo) nos dias 34 ao 54 foram muitas vezes maior do que os valores de OD medidos para as amostras de amostra fecais desses mesmos felinos após seu tratamento com o agente anti-helmíntico. Além disso, os valores de OD medidos para várias das amostras fecais colhidas do primeiro conjunto de felinos nos dias 34 ao 54 foram muitas vezes superior para cada uma das amostras de controle negativo da figura 15. Estes dados indicam que o anti-DIV6728 pAB não detecta o nematódeo nas fezes de um felino que estava livre de uma infecção anterior do nematódeo.

EXEMPLO 7

[00157] Uma versão truncada do DIV6728, Copro6728, está presente em fezes caninas infectadas com *T. canis*.

A. Preparação de amostras fecais caninas

[00158] Os animais caninos conhecidos por hospedar uma infecção por nematódeo (*T. canis*) ou não ter uma infecção por verme parasitário devido à fonte de amostras fecais. Uma amostra (aproximadamente 1 grama) de fezes caninas congeladas, sem conservantes agrupadas de cinco caninos infectados por nematódeo ou não infectados foi suspensa em 4 ml de tampão de extração ("tampão de extração" é 1X tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,0 a 7,5, com 0,05% de Tween-20). Este suspensão foi centrifugada por 2 minutos e depois foi centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos para produzir um primeiro sobrenadante. Esse primeiro sobrenadante foi então centrifugado a 10.000

rpm por 5 minutos para produzir um segundo sobrenadante. Este segundo sobrenadante é referido aqui como "extrato fecal".

B. Troca iônica

[00159] A cromatografia de troca iônica pode enriquecer o Copro6728 de uma amostra fecal. As amostras PLRS foram usadas para este estudo. As amostra fecais foram extraídas primeiro com PBST (0,05% de Tween 20), pH 7,3. A amostra foi diluída com tampão de citrato de sódio, pH 3,0 em primeiro lugar e, em seguida, o pH foi ajustado para 3 com HCl. Finalmente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi carregado em uma coluna sulfopropila (SP) (coluna Hi-Trap SP Sepharose, GE Healthcare). A coluna SP foi eluída com 20 mM de tampão de citrato de sódio, pH 3 com 1 M de NaCl, e as frações de eluição foram avaliadas por ELISA. A placa de ELISA foi revestida com IgG anti-6728 de coelho de 3 µg/ml. Com base nos resultados mostrados na figura 16, é evidente que o Copro6728 pode ser parcialmente purificado e enriquecido por eluição da coluna SP com tampão de citrato de sódio com 1 M de NaCl e o Copro6728 está na fração entre a A11 e C9 (figura 16).

C. Western blotting e SDS-PAGE

[00160] Western blotting e gel SDS-PAGE mostraram que o peso molecular do Copro6728 é cerca de 7 kD. As frações de eluição da coluna de SP foram misturadas e o pH do tampão foi ajustado para 7 com NaOH antes do carregamento em uma coluna de afinidade, que foi preparada ligando o IgG anti-6728 coelho com resina de AminoLink (Pierce, Thermo Scientific). A coluna foi lavada e eluída de acordo com instruções do fabricante. As frações de eluição foram carregadas em um gel gradiente Bis-Tris a 4-12% de 10 poços e transferidas para membrana de nitrocelulose para western blotting. Sonda com anti-6728IgG-HRP de coelho, western blotting mostrou que a banda principal (Copro6728) é cerca de 7 kD (seta vermelha na figura 17). Após

mais concentração, as mesmas amostras foram visualizadas em gel SDS-PAGE com Corante de Proteína Imperial (Pierce, Thermo Scientific). Uma banda 7 kD correspondente ao tamanho indicado pelo anti-6728IgG-HRP é visível (seta vermelha na figura 18).

D. Análise de espectrometria de massa

[00161] A análise por espectrometria de massa sobre o corte da faixa de gel SDS-PAGE (apontado por uma seta vermelha na figura 18) indicou que esta faixa continha Copro6728, e que a porção C-terminal do DIV6728 continha Copro6728.

[00162] A faixa de 7 kD que corresponde a faixa de 7 kD em Western blotting foi cortada do gel SDS-PAGE e enviada para o Centro Keck da Universidade de Yale para a análise de espectrometria de massa. A amostra no gel foi primeiramente digerida pela tripsina e depois analisada por LC-MS/MS usando o espectrômetro de massa Q-TOF Ultima (Waters). Dois peptídeos específicos foram encontrados na amostra por análise de espectrometria de massa: Peptídeo 1: R.FVPCTR.N (SEQ ID NO: 8) e Peptídeo 2: R.DAEGNCIK.F (SEQ ID NO: 9).

[00163] A análise de alinhamento nas sequências do DIV6728 (SEQ ID NO: 5) e os dois peptídeos identificados por análise MS, indicaram que ambos os peptídeos estão localizados na metade C-terminal do DIV6728 de sequência completa, confirmando que a faixa de 7 kb identificada por Western Blot é derivada do DIV6728. A localização das duas sequências peptídicas indica que uma porção C-terminal do DIV6728 (Copro6728) esteve presente nas amostras fecais positivas do *T. canis*. A figura 19 mostra a sequência completa do DIV6728 (SEQ ID NO: 5) com os dois peptídeos identificados por meio de análise MS em destaque nas caixas sombreadas.

EXEMPLO 8

[00164] Duas proteínas recombinantes foram geradas, que corres-

pondem a 64 aminoácidos na porção N-terminal do DIV6728 e 65 aminoácidos dentro da porção C-terminal do DIV6728.

[00165] Com base na análise MS, os dados de western blot e SDS-PAGE, duas novas construções de expressão codificando truncamentos do DIV6728 foram feitas. Elas foram nomeadas 6728N (SEQ ID NO: 10) e 6728C (SEQ ID NO: 11) para o N-terminal e C-terminal do DIV6728 de sequência completa, respectivamente. A figura 20 mostra um alinhamento das sequências de aminoácidos 6728N (SEQ ID NO: 10) e 6728C (SEQ ID NO: 11) codificadas pelas construções.

A. Genes sintéticos para expressar 6728N e 6728C recombinante

[00166] Os genes para expressar polipeptídeos 6728N e 6728C foram otimizados pelo códon para expressão em *E. coli*, sintetizados e clonados no vetor pET28 (a) com marcadores His (6) no N-terminal de cada proteína recombinante por GeneArt (Josef-Engert-Str. 11D-93053 Regensburg, Alemanha).

B. Expressão das proteínas recombinantes 6728N e 6728C

[00167] As proteínas recombinantes 6728N e 6728C foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas em uma única coluna de níquel. O plasmídeo pET28(a) 6728N foi transformado em BL21(DE3), crescido para um OD~ 0,8 e induzido com 1 mM IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranósido) a 37°C durante 2 horas. As células foram lisadas com Microfluidizer® Processor, M-11EH. O 6728N recombinante era solúvel em tampão Tris 20 mM, pH 8,0, com 500 mM de NaCl e foi purificado por etapa de eluição da coluna de níquel com diferente concentração de imidazol no tampão Tris 20 mM, pH 8,0, com 500 mM de NaCl. O 6728N recombinante foi eluído da coluna de níquel pelo mesmo tampão com 500 mM de imidazol. A figura 21 é um gel SDS-PAGE carregado com diferentes amostras para verificar a purificação do 6728N recombinante. O 6728N recombinante é de cerca de ~ 12

kD em tamanho (faixa 9) no gel.

[00168] O plasmídeo pET28(a) 6728C foi transformado em BL21 (DE3), crescido para um OD ~ 0,8 e induzido com 1 mM IPTG (isopropil-1-tio- β -D- galactopiranosídeo) a 37°C por 2 horas. As células foram lisadas com Microfluidizer® Processor, M-11EH. O 6728C recombinante foi solúvel no tampão Tris 20 mM, pH 8,0, com 500 mM de NaCl, foi purificado por etapa de eluição da coluna de níquel com diferente concentração de imidazol no tampão Tris 20 mM, pH 8,0, com 500 mM de NaCl. O 6728C recombinante foi eluído da coluna de níquel pelo mesmo tampão com 500 mM de imidazol. A figura 22 é um gel SDS-PAGE carregado com amostras diferentes para confirmar a purificação do 6728C recombinante. O 6728C recombinante é cerca de ~ 12 kD em tamanho (faixa 9) neste gel.

C. Anticorpos policlonais de coelho

[00169] O anticorpo policlonal de coelho produzido contra o 6728C detecta o antígeno em ELISA fecal, enquanto o anticorpo policlonal contra o 6728N não detecta o antígeno em ELISA fecal.

[00170] As proteínas recombinantes 6728C e 6728N, purificadas com uma única coluna de níquel, foram utilizadas para imunizar coelhos para a produção de anticorpo policlonal. Os anticorpos policlonais do soro de coelho imunizado foram purificados por afinidade com resina da proteína G e usados para revestir placas Immulon I a 2 µg/ml. Quatro amostras caninas diferentes foram testadas com diferentes placas revestidas de anticorpo. Os anticorpos dos dois coelhos imunizados com 6728C recombinante poderiam diferenciar as amostras fecais positivas do *T. canis* de amostras positivas de ancilostómo, tricurídeo e amostras negativas de nematódeo. Entretanto, os anticorpos dos dois coelhos imunizados com 6728N recombinante não conseguiram diferenciar as amostras fecais positivas do *T. canis* de amostras positivas de ancilóstomo, tricurídeo e amostras negativas de nemató-

deo (figura 23). Estes dados ELISA demonstram ainda que o Copro6728 é uma porção C-terminal do DIV6728 de sequência completa. Outros experimentos mostraram que os anticorpos produzidos contra o 6728C e o 6728N só reconhecem suas proteínas recombinantes cog-natas sem reatividade cruzada. (figura 24). Ambos destes anticorpos policlonais reagem com o DIV6728 recombinante de sequência completa como esperado (figura 24).

D. Western Blotting

[00171] O anticorpo policlonal de coelho contra o 6728C recombi-nante pode reconhecer as amostras de fezes positivas do *T. canis* em Western Blotting, mas não o anticorpo policlonal contra o 6728N re-combinante. Além do extrato fecal inteiro do *T. canis* (faixa 1), nema-tódeo negativo (faixas 2 a 4) e amostras fecais positivas do *T. canis* (faixas 5 a 7) foram fracionados por coluna SP com tampão de eluição de sal elevado (1 M de NaCl em 20 mM de tampão de citrato de sódio, pH 3). O extrato de verme do *T. canis* (faixa 1), as amostras carrega-das na coluna (faixa 2 e 5), coluna de fluxo passante (faixa 3 e 6), e coluna de eluição (faixa 4 e 7) foram carregados em 10 poços, gradi-ente gel de 4 a 12% Bis-Tris e posteriormente transferidos para mem-brana de nitrocelulose, sondados com conjugados diferentes, confor-me indicado nas figuras 25 a 27. Tanto o anti-6728-IgG-HRP e o anti-6728C-IgG-HRP de sequência completa podem diferenciar a amostra fecal positiva do *T. canis* das amostra fecais negativas do nematódeo (figura 25 e 26) Entretanto, o anti-6728N IgG-HRP não poderia dife-renciar estas duas amostras fecais diferentes (figura 27). Estes dados confirmaram ainda que o Copro6728 é de cerca de metade do tama-nho do DIV6728 de sequência completa, de acordo com os dados ob-tidos da análise de espectrometria de massa e ELISA fecal.

[00172] A invenção ilustrativamente descrita aqui adequadamente pode ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos,

limitação ou limitações que não são especificamente descritos aqui. Assim, por exemplo, em cada caso aqui qualquer um dos termos "compreendendo", "consistindo essencialmente de" e "consistindo por" pode ser substituído por qualquer um dos outros dois termos, mantendo seus significados comuns. Os termos e expressões que têm sido empregados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção de uso de tais termos e expressões de exclusão de quaisquer equivalentes das características apresentadas e descritas ou partes delas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis no âmbito da invenção reivindicada. Assim, deve-se entender que, embora a presente invenção tenha sido especificamente descrita pelas modalidades preferidas, características opcionais, modificação e variação dos conceitos divulgados aqui podem ser utilizados por qualquer versado na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas estar no escopo desta invenção, tal como definido pela descrição e reivindicações em anexado.

[00173] Uma série de exemplos para ajudar ilustrar a invenção tem sido descrita. No entanto, será entendido que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da invenção. Assim, outras modalidades estão no escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

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

(a) contatar uma amostra de um mamífero com um ou mais anticorpos que possam se ligar especificamente a um polipeptídeo tendo sequência de aminoácido que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, ou ao Copro6728 ou a uma parte antigênica dos mesmos;

(b) formar complexos anticorpo-polipeptídeo na presença de polipeptídeos se houver, na amostra, e

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

2. Método para diagnosticar se um mamífero está infectado com uma infecção intestinal por nematódeo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) contatar uma amostra de um mamífero com um ou mais anticorpos que possam se ligar especificamente a um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, ou ao Copro6728, ou a uma parte antigênica dos mesmos;

(b) formar complexos anticorpo-polipeptídeo na presença de polipeptídeos, se houver, na amostra;

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

(d) diagnosticar o mamífero como tendo a infecção por nematódeo se um complexo anticorpo-polipeptídeo do nematódeo estiver presente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a amostra é obtida de um mamífero que é um

canino ou um felino.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o nematódeo é *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra fecal.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que um ou mais anticorpos não se ligam especificamente a qualquer coproantígeno derivado do grupo consistindo em ancilóstomo, tricurídeo, e dirofilária.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a etapa para detectar a presença ou ausência dos complexos inclui ainda a etapa de fornecer pelo menos um anticorpo secundário que se liga a pelo menos um dos complexos.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que pelo menos um anticorpo secundário é marcado.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos anticorpos são marcados.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que um ou mais anticorpos são imobilizados em um suporte sólido.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido faz parte de um dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima é um dispositivo de imunoensaio de fluxo lateral.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de colocar a amostra em contato com um ou mais reagentes para detectar um ou mais do grupo que consiste em: um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os reagentes para detecção de qualquer um ou todos de um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, um ou mais vírus, um ou mais fungos e uma ou mais bactérias são um ou mais anticorpos, ou um ou mais antígenos reconhecidos por anticorpos específicos para um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de verme, um ou mais vírus, um ou mais fungos ou um ou mais bactérias.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa para determinar a presença ou ausência de um ácido nucleico do nematódeo.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico tem uma sequência que corresponde a toda ou uma parte da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa para determinar a presença ou ausência do ácido nucleico é realizada usando um ensaio baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR).

18. Dispositivo para detectar a presença ou ausência de antígenos do nematódeo a partir de uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende um suporte sólido, em que o suporte sólido tenha imobilizado nele um ou mais anticorpos que são capazes de se ligar especificamente a um polipeptídeo que tem uma sequência de amino-

ácido que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, ou ao Copro6728 ou a parte antigênica dos mesmos.

19. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que um ou mais anticorpos são obtidos por imunização com o polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido que corresponde à SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 ou ao Copro6728, ou a uma parte antigênica dos mesmos.

20. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra fecal.

21. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 20, caracterizado pelo fato de que um ou mais anticorpos não se ligam especificamente a qualquer coproantígeno derivado do grupo consistindo em ancilóstomo, tricurídeo, e dirofilária.

22. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 21, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos anticorpos são marcados.

23. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 22, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

24. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima é um dispositivo de imunoensaio de fluxo lateral.

25. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 24, caracterizado pelo fato de que a amostra é de um canino ou felino.

26. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 25, caracterizado pelo fato de que o dispositivo inclui ainda um ou mais reagentes para a detecção de um ou mais dos gru-

pos consistindo em: um ou mais parasitas de verme não nematódeo, um ou mais parasitas sem ser de vermes, um ou mais vírus, um ou mais fungos, e uma ou mais bactérias.

27. Kit para detectar um ou mais antígenos do nematódeo em uma amostra de mamíferos, caracterizado pelo fato de que compreende o dispositivo, como definido em qualquer uma das reivindicações de 18 a 26, e um ou mais reagentes suficientes para a detecção de um ou mais antígenos.

28. Kit, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais reagentes são selecionados do grupo consistindo em um ou mais reagentes indicadores, um ou mais compostos de marcação de anticorpos, um ou mais anticorpos, um ou mais reagentes de captura de antígenos, um ou mais inibidores, e um ou mais reagentes de lavagem.

```
agtcagtagc cactttaatc catcagaatg ctctctgttc ttgcgctttt cgctcttatt    60
acttttgctg tggccggtcc ggaaagctgc ggtccaaacg aagtgtggac tgaatgtacc    120
ggttgcgaaat tgaaatgtgg gcaagatgaa aatacgccgt gcacactaaa ctgtcgaccg    180
ccgtcatgtg agtgctctcc aggaagaggc atgagacgaa ccaacgatgg aaggtgcatt    240
ccggctagtc agtgcccgca acacagggcc aagagagagg agcaatgcaa gccaaatgag    300
cagtggtcac cgtgccgagg atgtgaagga acatgcgcac aaagatttgt cccttgact    360
agaaaactgcc gaccaccagg ctgtgaatgc gttgctggcg caggtttcgt acgtgacgct    420
gaaggaaact gcatcaagtt cgacgattgc ccgaagtaaa taataaccat acaaattgct    480
gattccaatt aaaataataa atgagtccag ctgttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa    535
```

(SEQ ID NO:1)

FIG. 1

cagtcagcag	ctacttttat	ccatcggaat	gctctctggt	cttgcgcttt	tcgctcttat	60
tactttcgct	gtggccgata	cgaaaagtgt	cggtccaaac	gaagtgtgga	ctgaatgtac	120
cggttgcgag	ttgaaatgcg	ggcaggatga	ggatacgccg	tgcacactaa	actgtcggcc	180
gccgtcatgt	gagtgtcac	caggaagagg	catgagacga	accgacgatg	ggaggtgcat	240
tccggctagt	cagtgcgccg	aacacagagc	caagagagag	gagcagtgca	agccaaatga	300
gcagtgggtca	ccgtgccgag	gatgtgaagg	aacatgcgca	caaagatttg	tcccttgcac	360
tagaaactgc	cgaccaccag	gatgtgaatg	cgttgctggc	gcaggtttcg	tacgtgacgc	420
tgcaggaaat	tgcataagt	tcgacgattg	cccgaagtaa	ataataacca	tactaattgc	480
tgattacaat	taaaataata	aatgagtcca	gctgttaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa	536

(SEQ ID NO:2)

FIG. 2

agtcagtagc	cactttaatc	catcagaatg	ctctctgttc	ttgcgctttt	cgctcttatt	60
		M	L S V L	A L F	A L I	11
acttttgctg	tggccggtcc	ggaaagctgc	ggtccaaacg	aagtgtggac	tgaatgtacc	120
T F A V	A G P	E S C	G P N E	V W T	E C T	31
ggttgcgaa	tgaaatgtgg	gcaagatgaa	aatacgccgt	gcacactaaa	ctgtcgaccg	180
G C E L	K C G	Q D E	N T P C	T L N	C R P	51
ccgtcatgtg	agtgtctctcc	aggaagagggc	atgagacgaa	ccaacgatgg	aaggtgcatt	240
P S C E	C S P	G R G	M R R T	N D G	R C I	71
ccggctagtc	agtgcccgca	acacagggcc	aagagagagg	agcaatgcaa	gccaaatgag	300
P A S Q	C P Q	H R A	K R E E	Q C K	P N E	91
cagtggtcac	cgtgccgagg	atgtgaagga	acatgcgcac	aaagatttgt	cccttgcaact	360
Q W S P	C R G	C E G	T C A Q	R F V	P C T	111
agaaactgcc	gaccaccagg	ctgtgaatgc	gttgctggcg	caggtttcgt	acgtgacgct	420
R N C R	P P G	C E C	V A G A	G F V	R D A	131
gaaggaaact	gcatcaagtt	cgacgattgc	ccgaagtaaa	taataaccat	acaaattgct	480
E G N C	I K F	D D C	P K *			143
gattccaatt	aaaataataa	atgagtccag	ctgttaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaa	535

(Sequência do nucleotídeo é SEQ ID NO:1; Sequência do aminoácido é SEQ UD NO: 3)

FIG. 3

cagtcagcag	ctacttttat	ccatcgggaat	gctctctggt	cttgcgcttt	tcgctcttat	60
		M	L S V	L A L F	A L I	11
tactttcgct	gtggccgatc	cgaaaagtgtg	cggtccaaac	gaagtgtgga	ctgaatgtac	120
T F A	V A D P	K S C	G P N	E V W T	E C T	31
cggttgcgag	ttgaaatgcg	ggcaggatga	ggatacgccg	tgcacactaa	actgtcggcc	180
G C E	L K C G	Q D E	D T P	C T L N	C R P	51
gccgtcatgt	gagtgtctcac	caggaagagg	catgagacga	accgacgatg	ggaggtgcat	240
P S C	E C S P	G R G	M R R	T D D G	R C I	71
tccggctagt	cagtgtccgc	aacacagagc	caagagagag	gagcagtgca	agccaaatga	300
P A S	Q C P Q	H R A	K R E	E Q C K	P N E	91
gcagtgggtca	ccgtgccgag	gatgtgaagg	aacatgcgca	caaagatttg	tcccttgcac	360
Q W S	P C R G	C E G	T C A	Q R F V	P C T	111
tagaaactgc	cgaccaccag	gatgtgaatg	cgttgctggc	gcaggtttcg	tacgtgacgc	420
R N C	R P P G	C E C	V A G	A G F V	R D A	131
tgcaggaaat	tgcatcaagt	tcgacgattg	cccgaagtaa	ataataacca	tactaattgc	480
A G N	C I K F	D D C	P K *			143
tgattacaat	taaaataata	aatgagtcca	gctgttataaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa	536

(Sequência do nucleotídeo é SEQ ID NO:2; Sequência do aminoácido é SEQ UD NO: 4)

FIG. 4

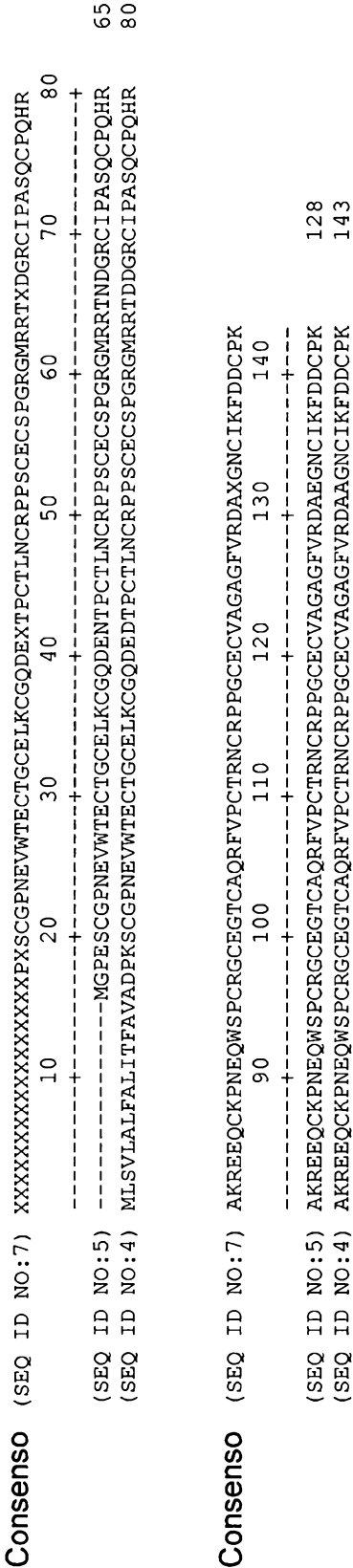


FIG. 5

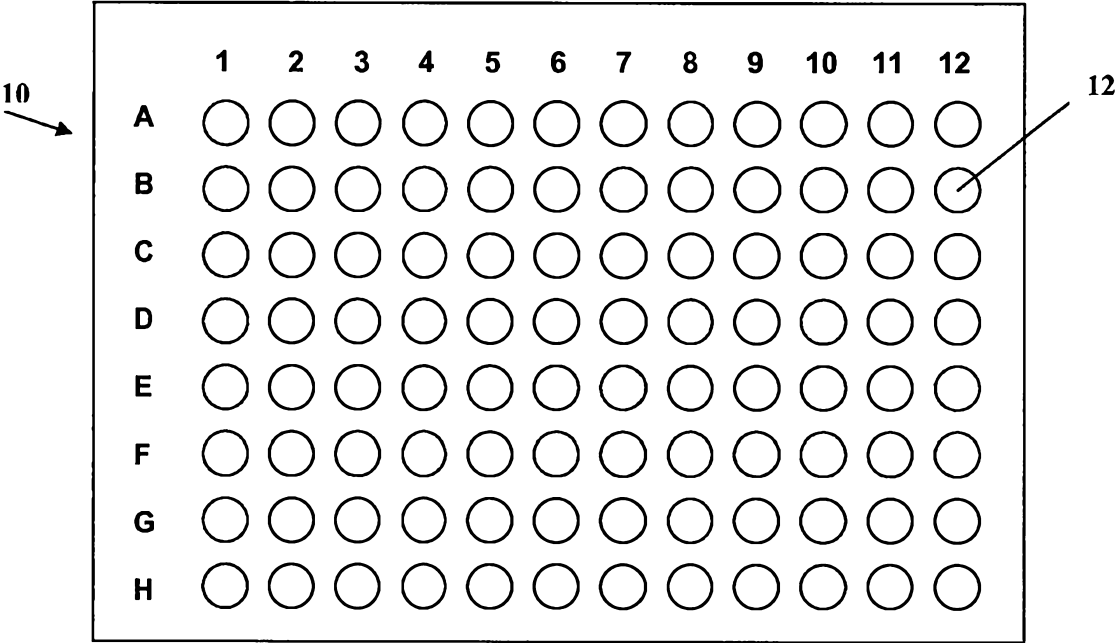


FIG. 6A

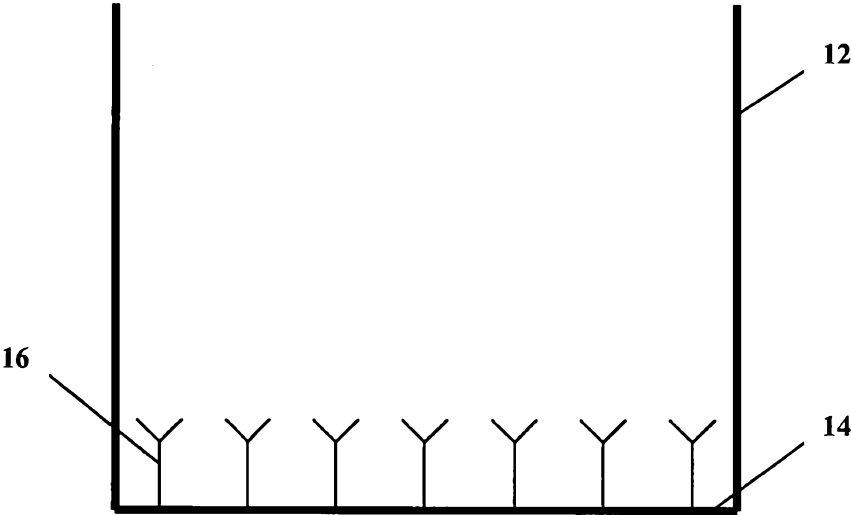
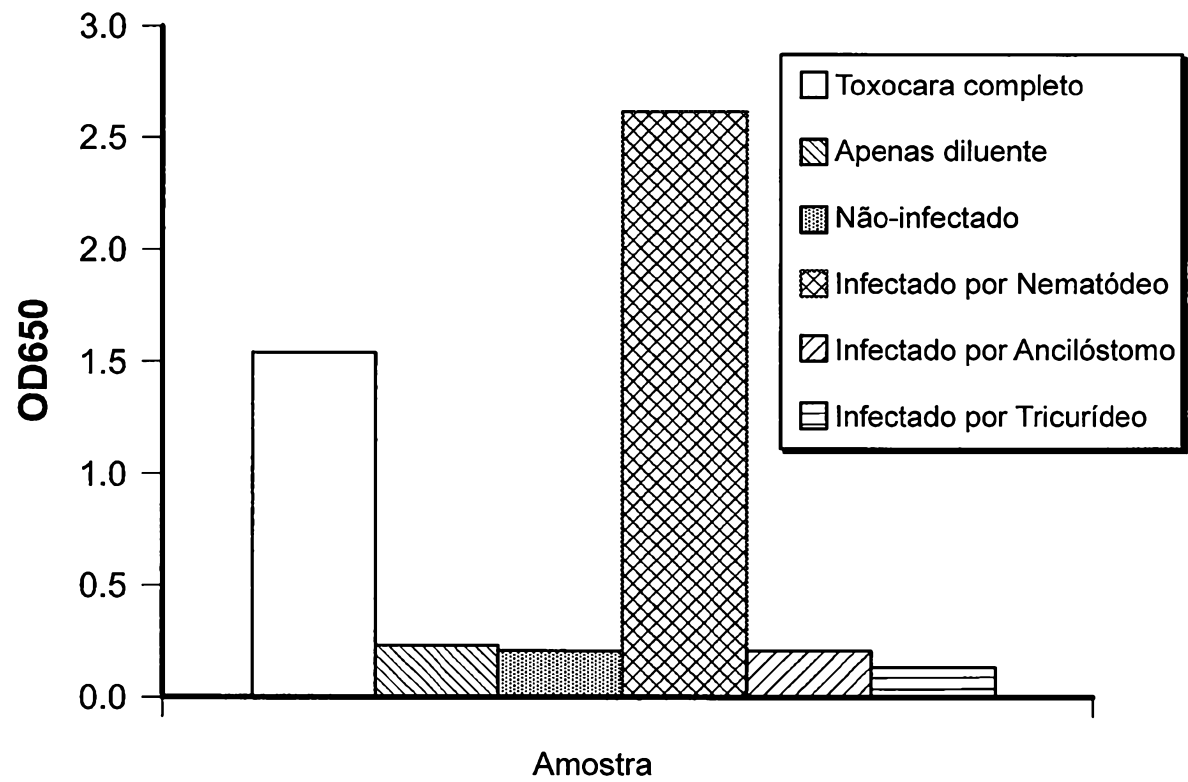


FIG. 6B

**FIG. 7**

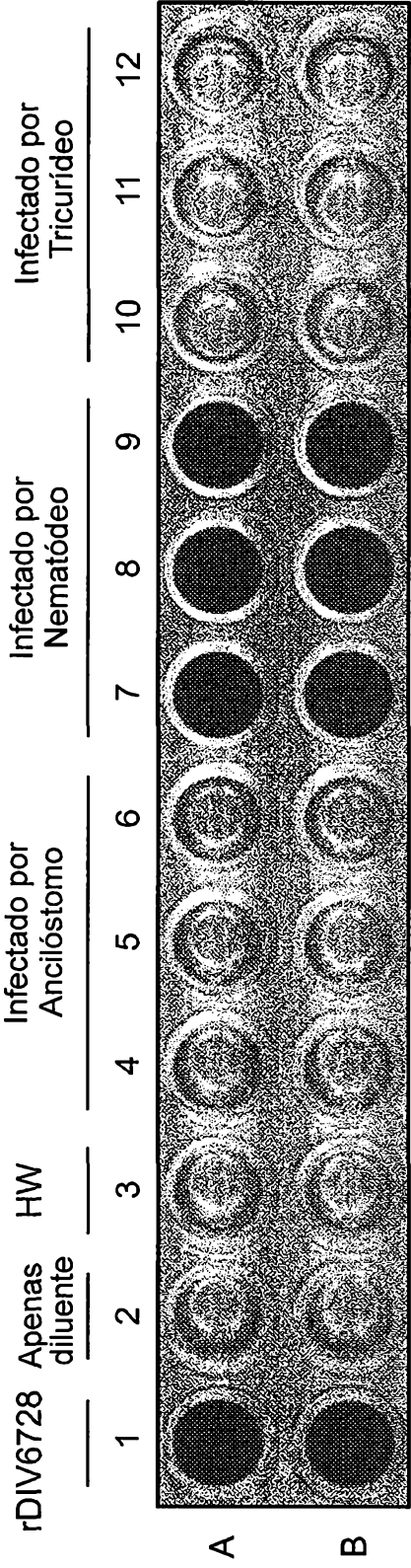


FIG. 9

9/28

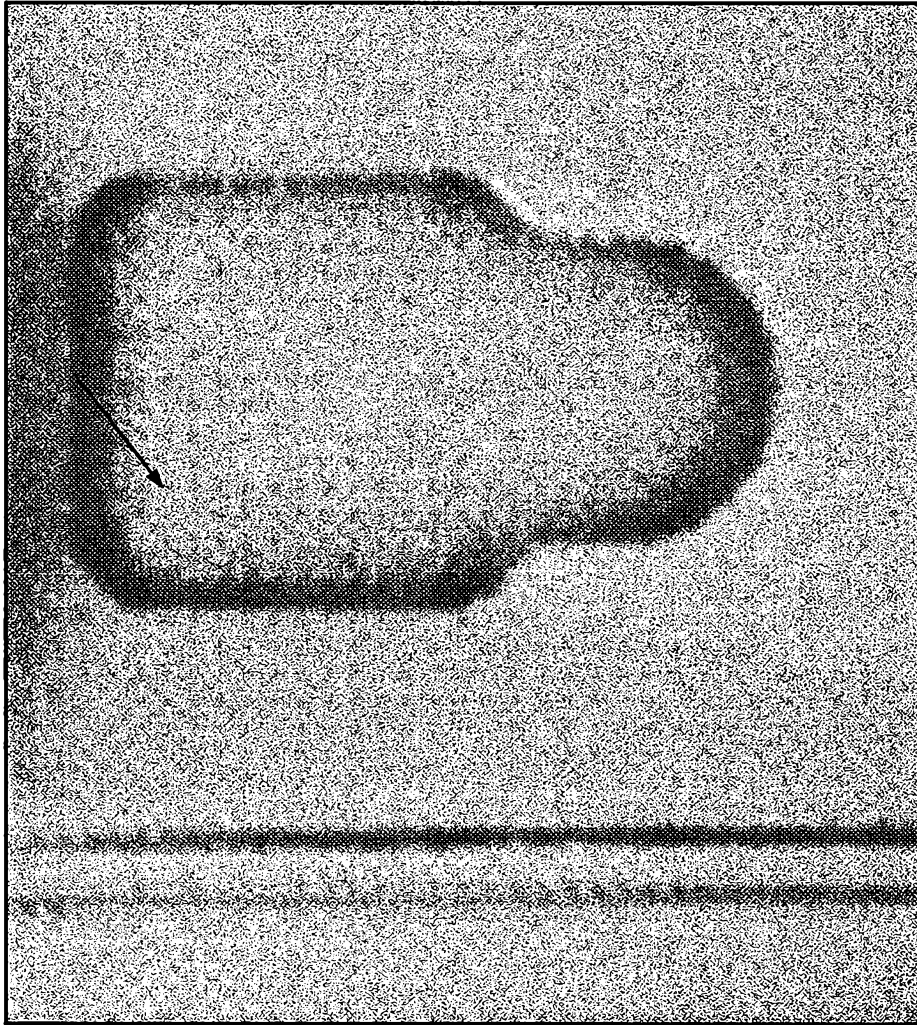


FIG. 10A

10/28

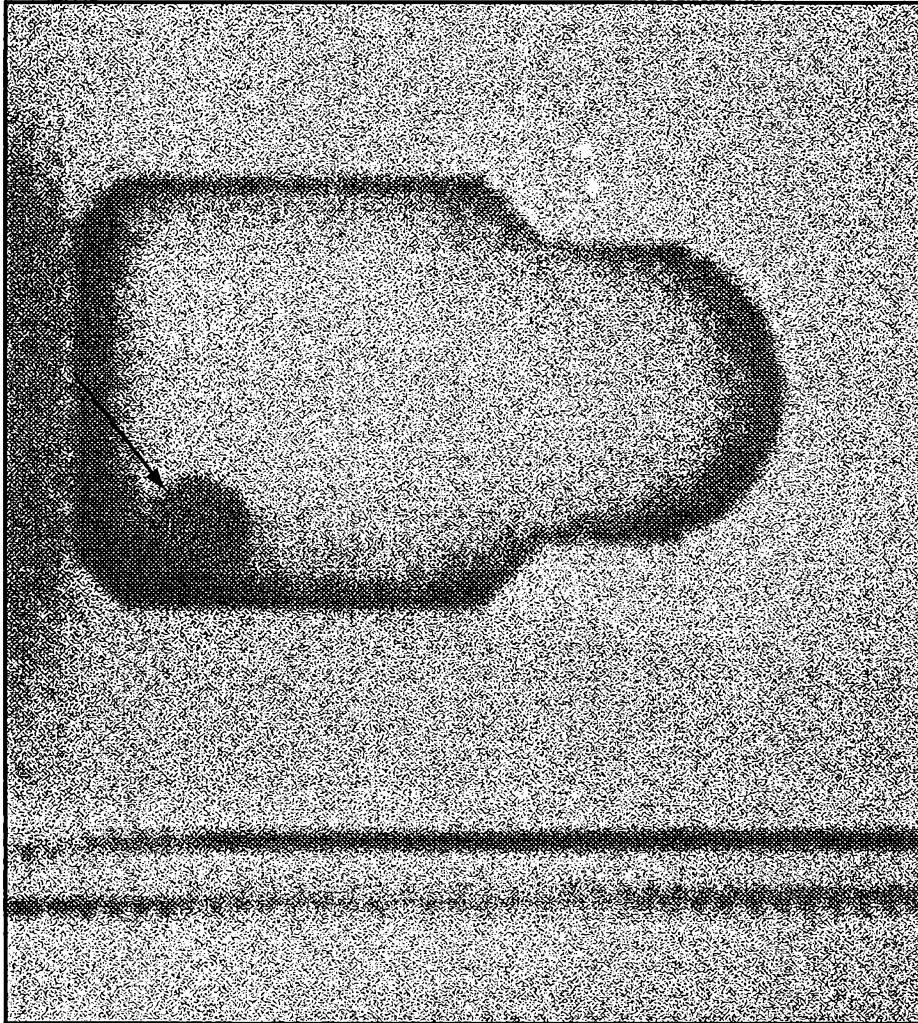


FIG. 10B

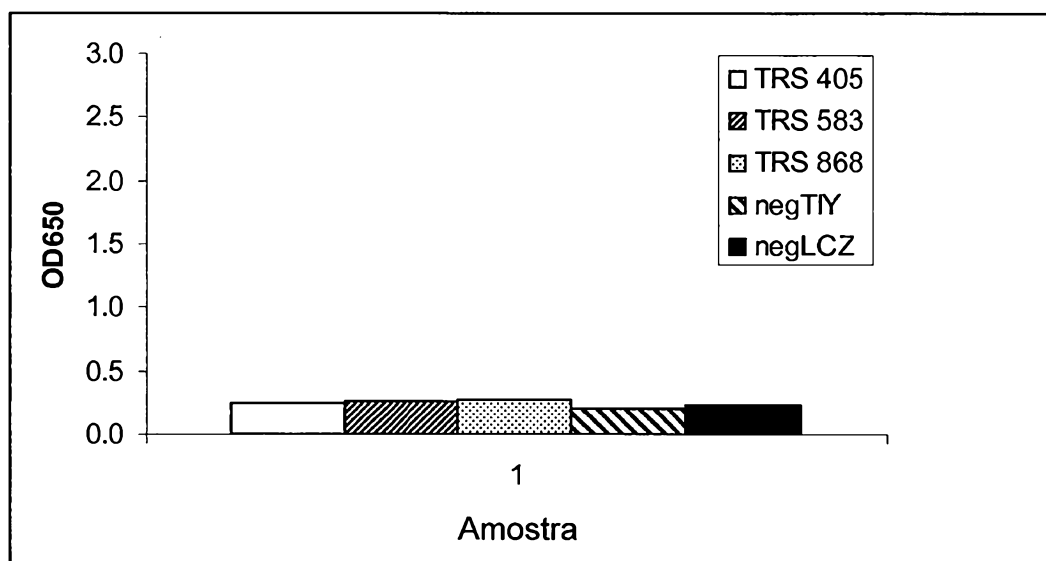


FIG. 8

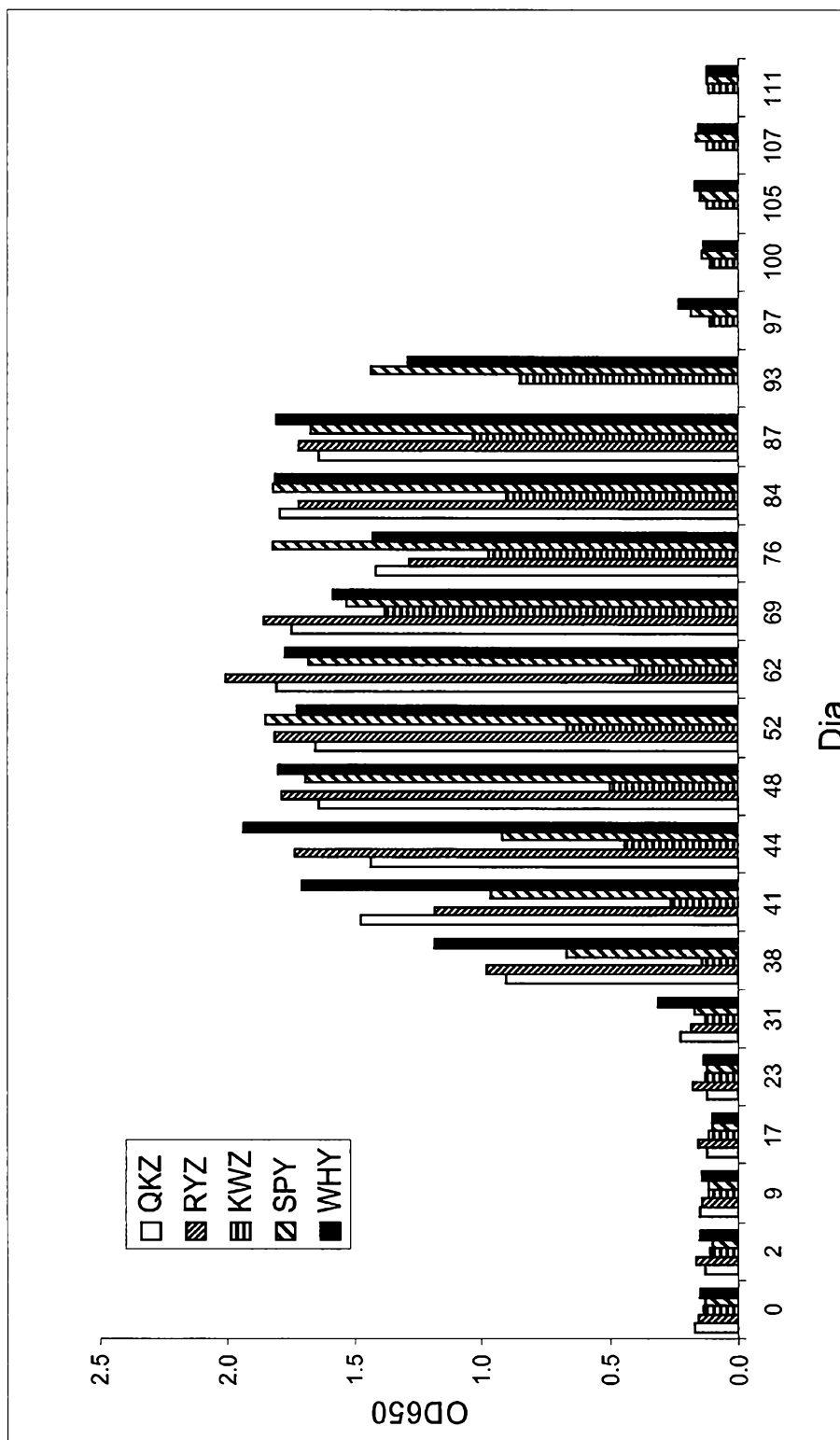


FIG. 11

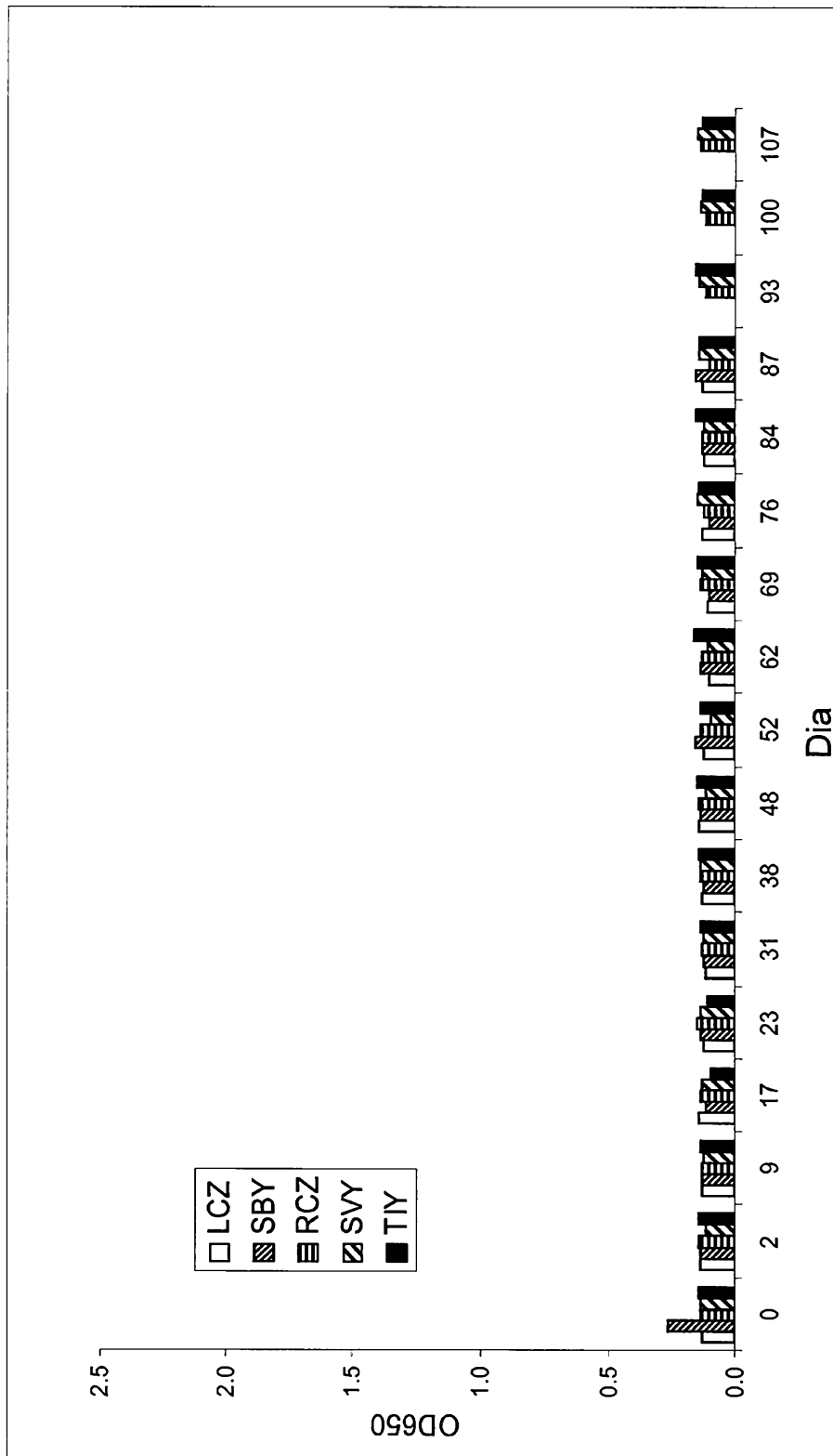
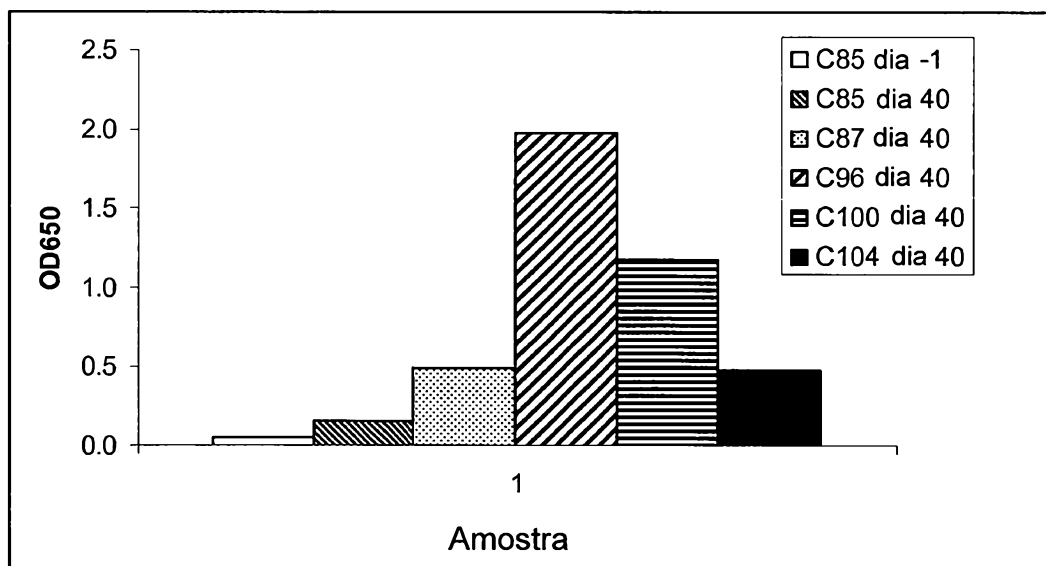


FIG. 12

**FIG. 13**

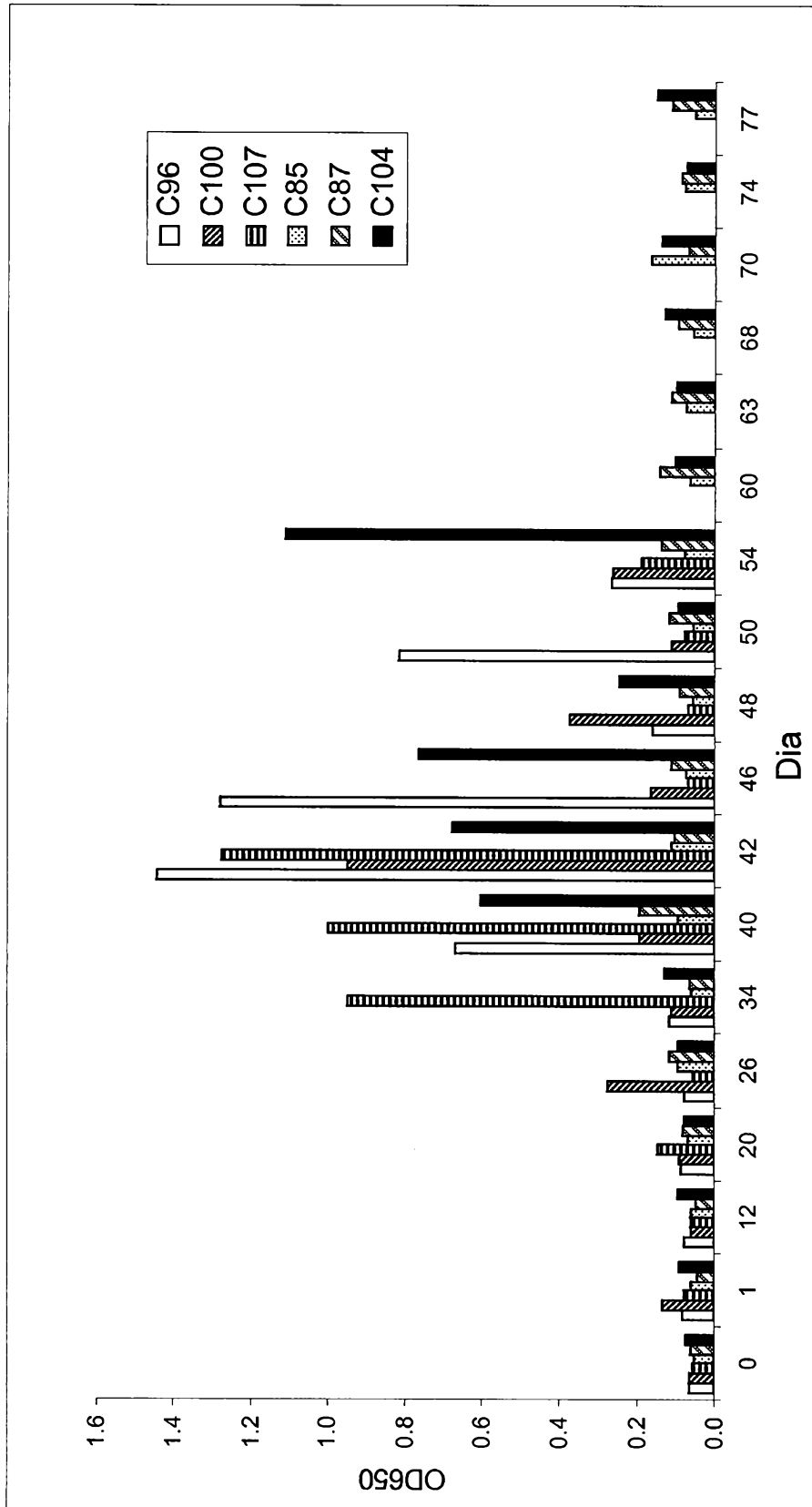


FIG. 14

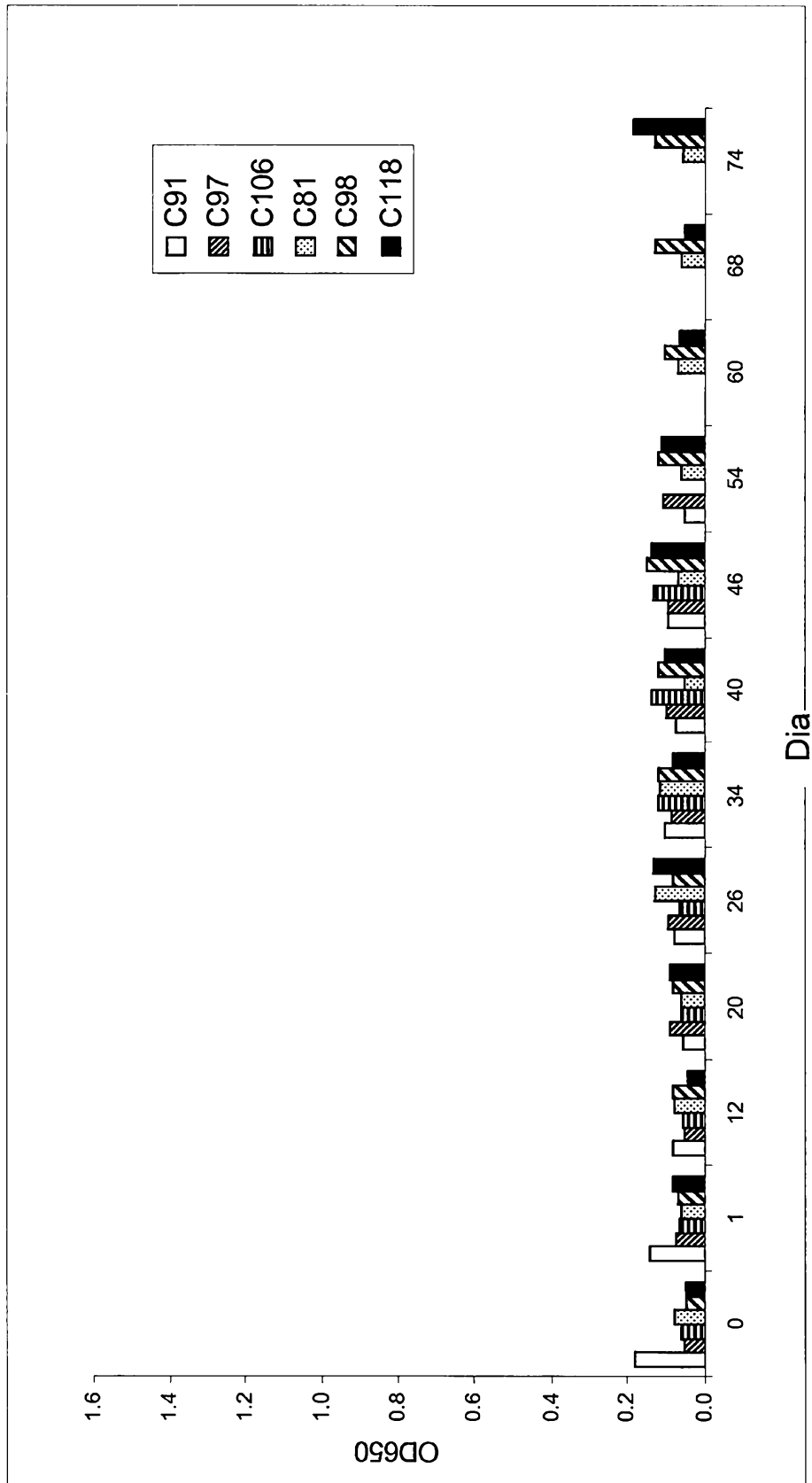
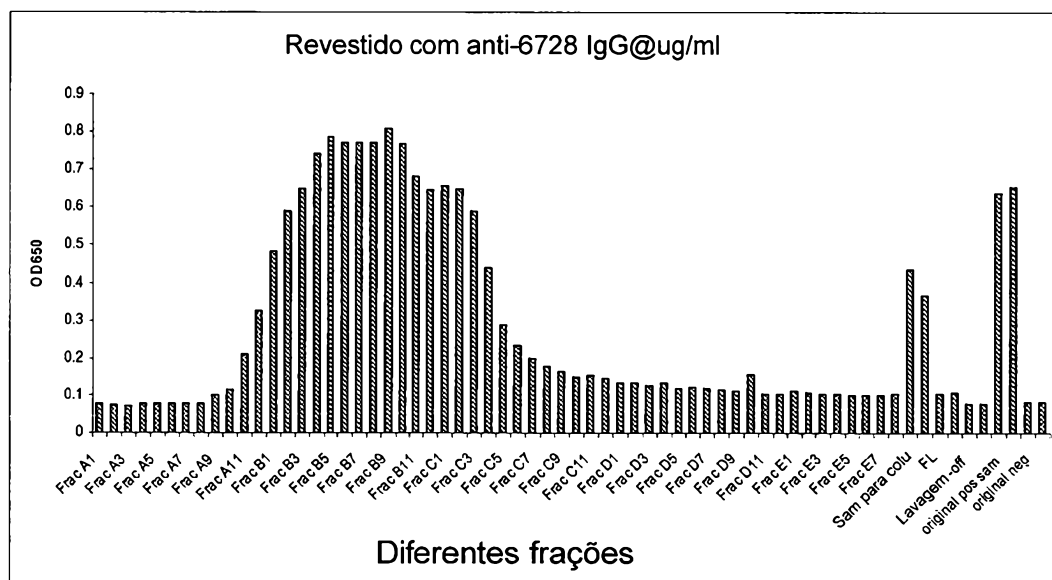


FIG. 15

**FIG. 16**

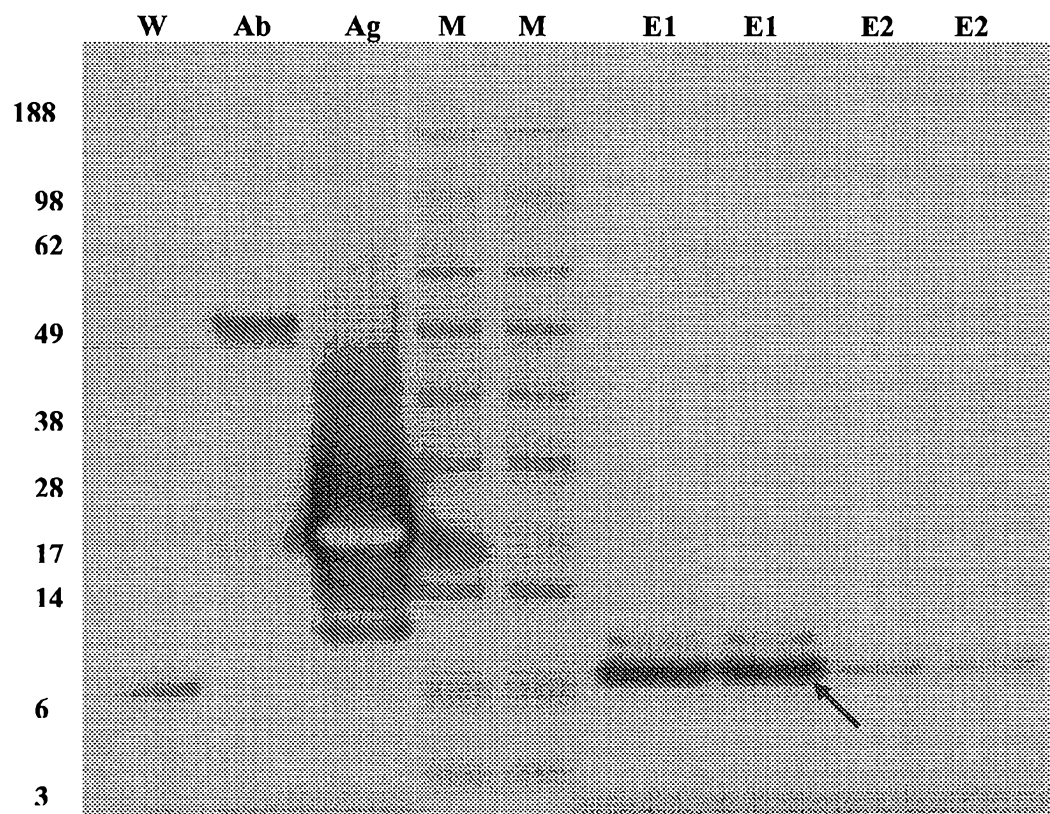


FIG. 17

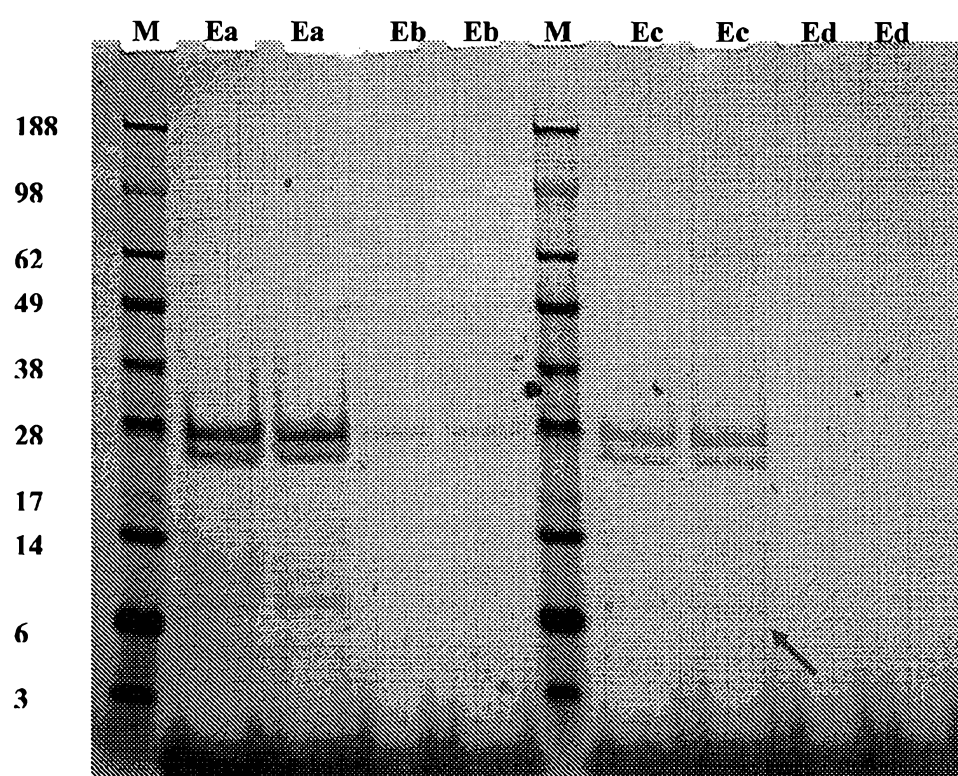


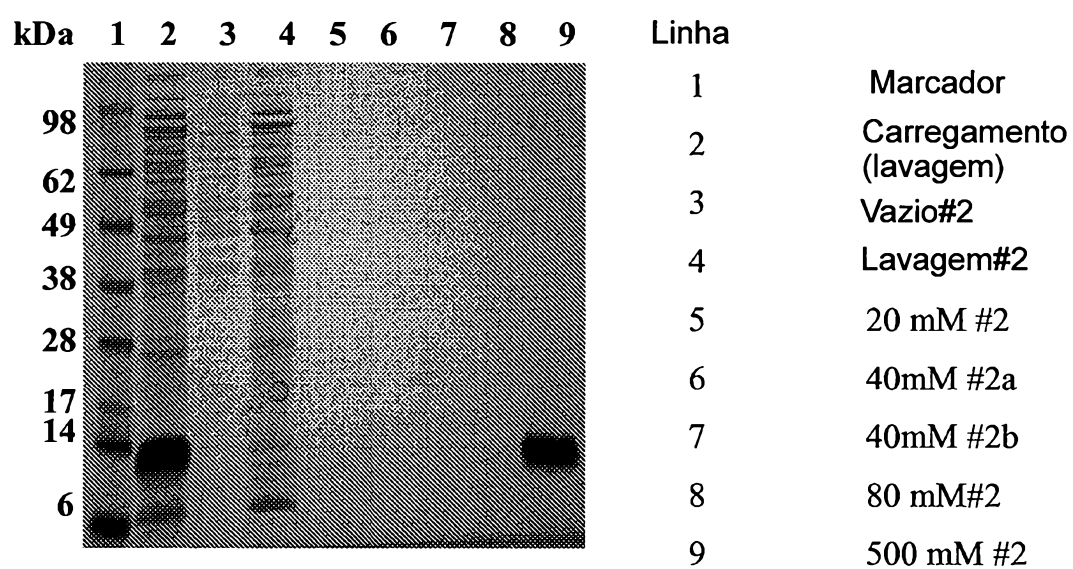
FIG. 18

MGPESCGPNEVWTECTGCELKCGQDENTPCTLNCRPPSCECSPGRGMRRRTNDGRCIPASQCP
OHRAKREEQCKPNEQWSPCRGCEGTCAQRFPCTRNCRPPGCECVAGAGFVRDAEGNCIK
EDDCPK (SEQ ID NO: 5)

FIG. 19

21/28

FIG. 20

**FIG. 21**

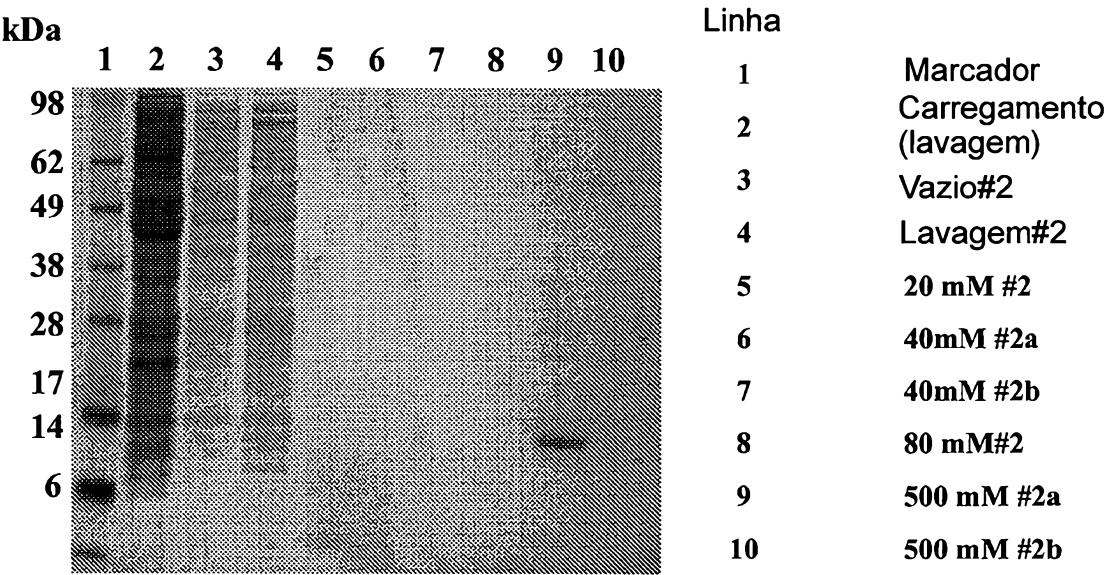
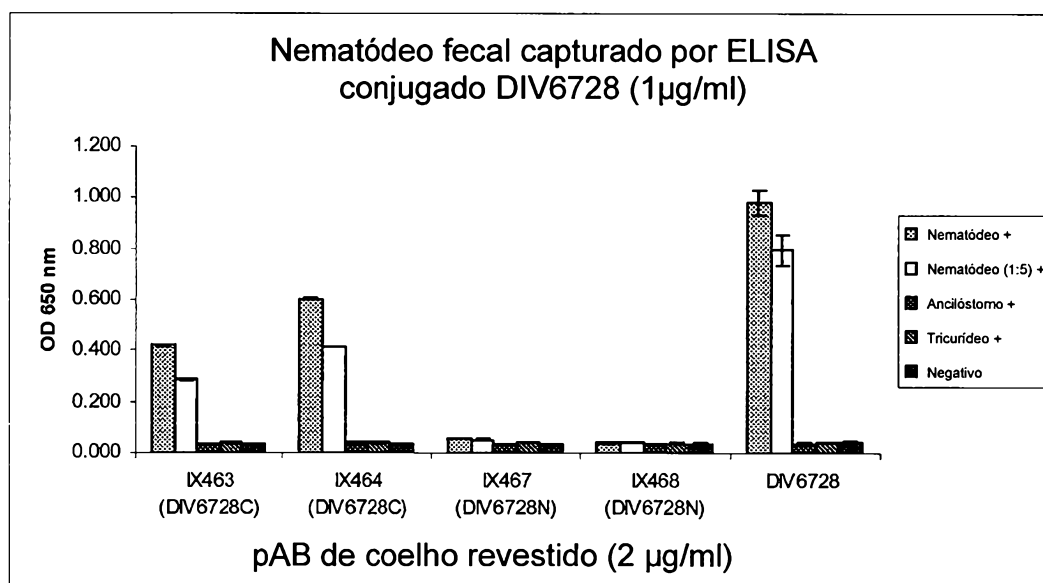
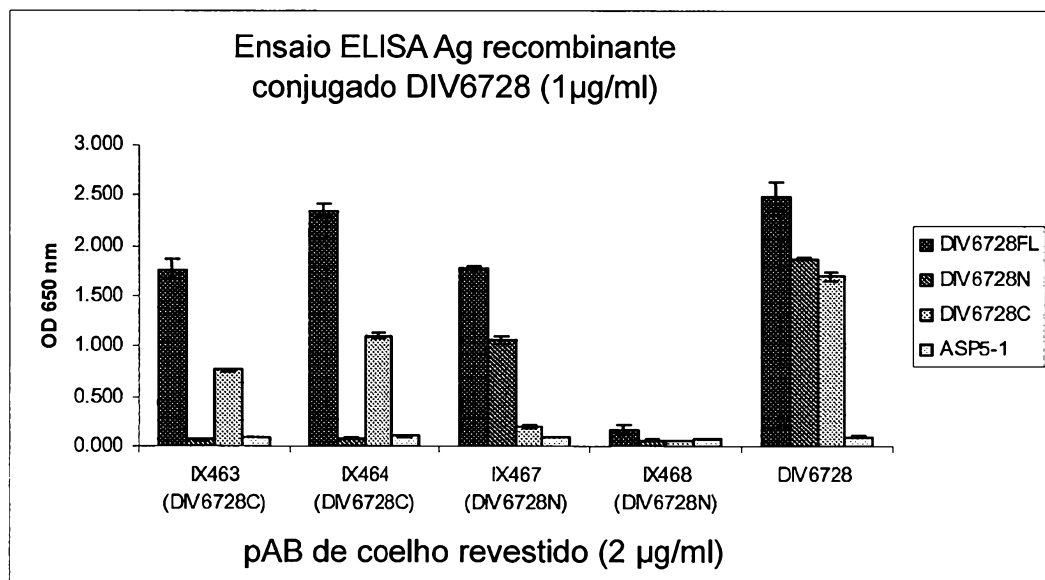


FIG. 22

**FIG. 23**

**FIG. 24**

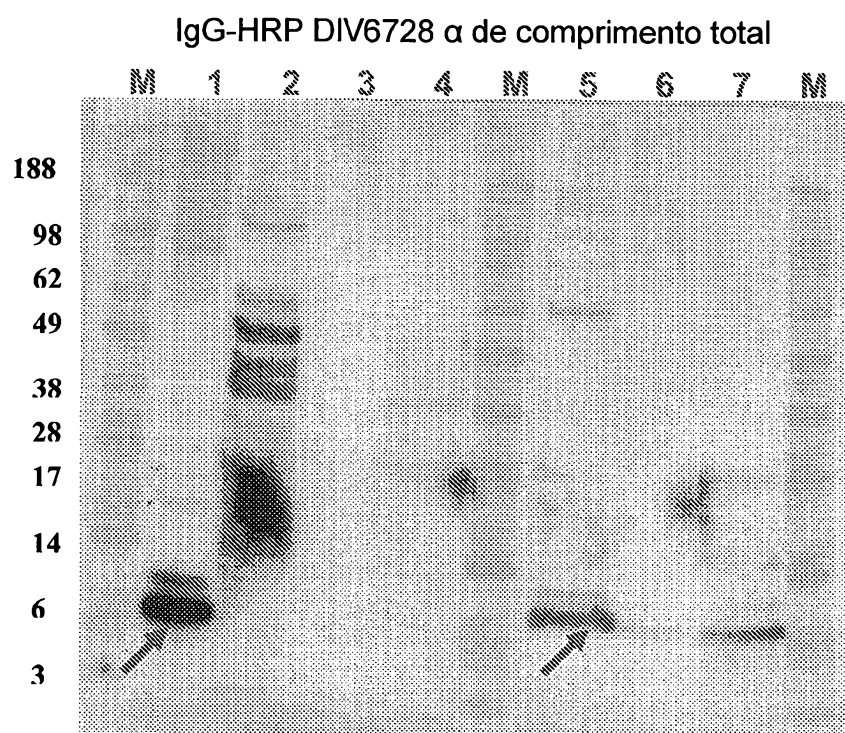


FIG. 25

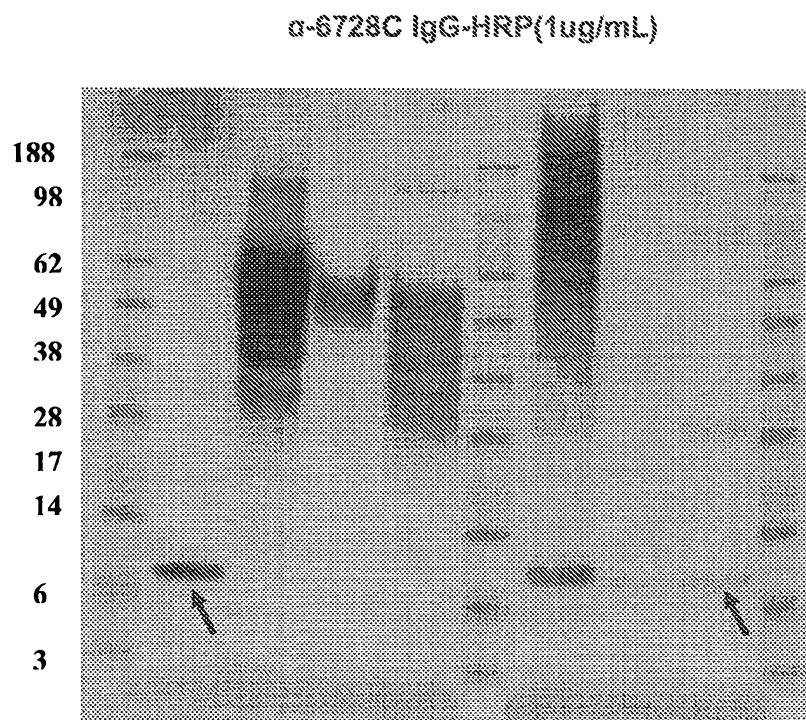


FIG. 26

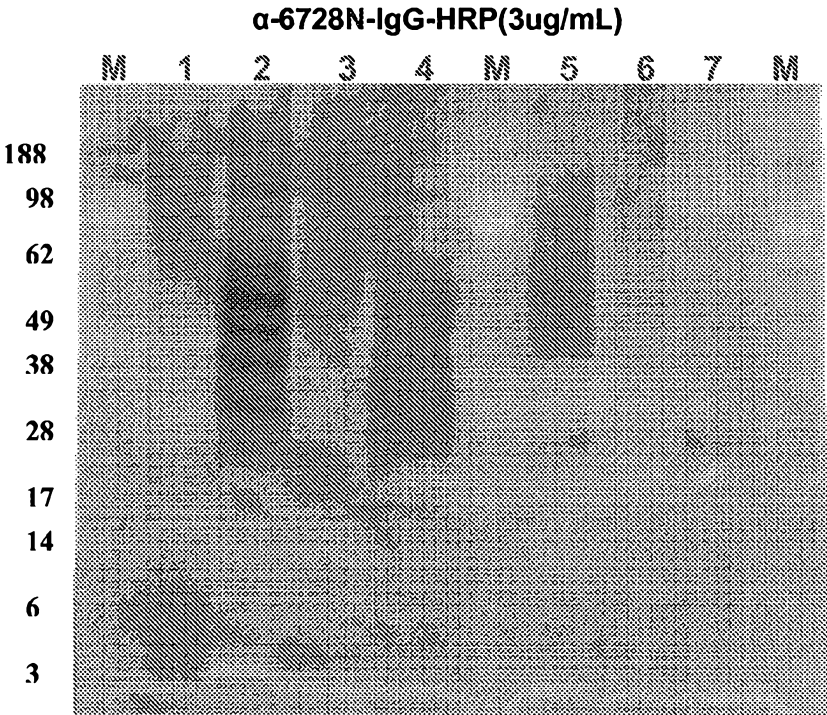


FIG. 27