

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 324**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
C07K 14/29	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 19150904 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022 EP 3527221**

54 Título: **DIVA de Ehrlichia canis (que diferencia animales infectados de vacunados)**

30 Prioridad:

31.10.2007 US 98401907 P

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

01.06.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 913 324 T3

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

DESCRIPCIÓN

DIVA de *Ehrlichia canis* (que diferencia animales infectados de vacunados)

5 La presente invención se refiere a métodos para determinar la presencia de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno que son específicos para *Ehrlichia canis*, composiciones usadas en dichos métodos, y métodos relacionados para monitorear el tratamiento de una infección por *E. canis*.

10 Los *Ehrlichia* son patógenos intracelulares obligatorios que infectan los glóbulos blancos circulantes en los hospederos mamíferos. *Ehrlichia canis* puede infectar a caninos y humanos y causar ehrlichiosis monocítica canina (CME) y ehrlichiosis monocítica humana (HME), respectivamente. La enfermedad canina se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, pérdida de peso y pancitopenia. En los seres humanos, la enfermedad se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, mialgia y leucopenia. La detección y el tratamiento tempranos son importantes para el tratamiento de la ehrlichiosis canina y humana.

15 En este contexto, los documentos NO US 2006/0234322 A1 y WO 2008/043000 A2 describen los antígenos de *E. canis* que pueden usarse para diferenciar a los infectados de, por ejemplo, los animales vacunados.

20 La presente invención se refiere a las modalidades como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Además, en la presente descripción se describe un método para distinguir entre los animales (a) que se infectaron con *Ehrlichia canis*; y (b) los animales que no se infectaron con *E. canis* independientemente de si el animal se vacunó contra *E. canis*. El método comprende

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

30 (b) detectar si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados.

Si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados, entonces el animal está infectado con *E. canis*. El uno o más primeros polipéptidos purificados pueden tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos de longitud. El uno o más primeros polipéptidos purificados pueden unirse a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones. El método puede comprender además determinar si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente a uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados que son un elemento de una vacuna contra *E. canis*. Si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal se infectó con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal no se infectó con *E. canis* y se vacunó contra *E. canis*. Si los anticuerpos en la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos purificados, entonces el animal no se vacunó contra *E. canis* y no se infectó por *E. canis*.

50 También se describe en la presente descripción un método para determinar el estado de vacunación e infección de un animal referente a *E. canis*. El método comprende:

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

60 (b) detectar si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados y al uno o más segundos polipéptidos purificados.

Si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal se infectó con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno

o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal no se infectó con *E. canis* y se vacunó contra *E. canis*. Si los anticuerpos en la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos purificados, entonces el animal no se vacunó contra *E. canis* y no se infectó por *E. canis*. El uno o más primeros polipéptidos purificados pueden tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos de longitud. El uno o más primeros polipéptidos purificados pueden unirse a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones.

Además, en la presente descripción se describe un método para determinar la presencia de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno que son específicos para *E. canis*, en una muestra de prueba. El método comprende:

- (a) poner en contacto la muestra de prueba con uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO:22-33 en donde el uno o más polipéptidos purificados tienen aproximadamente de 15 a aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, y en donde el uno o más primeros polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*, en condiciones adecuadas para la unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno; y
- (b) detectar la presencia de unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno.

La presencia de unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno indica la presencia de los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno específicos para *E. canis* en la muestra de prueba. El uno o más polipéptidos purificados pueden unirse a una secuencia de aminoácidos heteróloga, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones. El método puede comprender además detectar la cantidad de unión específica. El uno o más polipéptidos purificados pueden inmovilizarse en un soporte sólido.

Además, en la presente descripción se describe una composición que comprende:

- (a) uno o más polipéptidos purificados que consisten en las SEQ ID NO:22-33; o
- (b) uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95 % de identidad con las SEQ ID NO:22-33 en donde el uno o más polipéptidos purificados tienen de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, y en donde el uno o más polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*;
- (c) La SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 1 está ausente o es C, X en la posición 4 es H o Q, X en la posición 25 es D o G, y X en la posición 36 es E o G;
- (d) los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 1 es C, X en la posición 4 es H, X en la posición 25 es D o G;
- (e) los aminoácidos 13-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G; y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (f) los aminoácidos 24-49 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (g) los aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 1 es C o está ausente, y en donde X en la posición 25 es D o G;
- (h) los aminoácidos 13-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (i) los aminoácidos 24-49 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (j) los aminoácidos 13-27 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (k) los aminoácidos 24-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (l) los aminoácidos 13-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (m) los aminoácidos 24-49 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (n) los aminoácidos 24-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino; o
- (o) combinaciones de (a)-(n).

El uno o más polipéptidos purificados pueden estar en una forma multimérica. El uno o más polipéptidos purificados pueden unirse a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones.

Además, en la presente descripción se describe un método para generar una respuesta inmunitaria en un animal que comprende administrar uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO:22-33 o una de sus combinaciones al animal, en donde el uno o más polipéptidos purificados generan una respuesta inmunitaria en el animal. El uno o más polipéptidos purificados pueden tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 aminoácidos de longitud. El uno o más polipéptidos purificados pueden estar en una forma multimérica. El uno o más polipéptidos purificados pueden unirse a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones.

Además, en la presente descripción se describe un método para la profilaxis, tratamiento o mejora de una infección por *Ehrlichia canis* en un animal que comprende administrar al animal:

(a) uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:22-33, o una de sus combinaciones; o

(b) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos purificados que comprenden la SEQ ID NO:22-33, o una de sus combinaciones; o

(c) uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos purificados que comprenden la SEQ ID NO:22-33, o una de sus combinaciones;

de manera que se evita, mejora, o trata la infección por *E. canis*.

Además, en la presente descripción se describe un método para monitorear el tratamiento de una infección por *E. canis* en un paciente que comprende: (a) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una primera muestra de un paciente antes o en las primeras etapas de un tratamiento para una infección por *E. canis* por un método de acuerdo con la reivindicación 10; (b) determinar el nivel de los anticuerpos anti-*E. canis* en una segunda muestra del paciente después de efectuar el tratamiento mediante un método de acuerdo con la reivindicación 10; y (c) comparar la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* en la primera muestra con la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* en la segunda muestra para evaluar un cambio y de esta manera monitorear el tratamiento.

Las figuras muestran:

La Figura 1 muestra la evaluación del ensayo SNAP® 3Dx® de beagles de laboratorio. El dispositivo SNAP® se usó como se describió por el fabricante. La muestra "Pre" es del día 0. La muestra "Pos" es del día 42. El punto positivo de *E. canis* se convirtió en positivo en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

La Figura 2 muestra un gel de proteínas de *E. canis* separadas mediante el uso de electroforesis en gel 2D. Tinción con Azul Coomassie BIOSAFE™ (Bio-Rad Inc.).

La Figura 3 muestra una inmunotransferencia western de proteínas de *E. canis* mediante el uso de sueros de perro recolectados en el día 0. La dilución del plasma es 1:100. Estos perros fueron negativos para la reactividad con los antígenos de *E. canis*.

La Figura 4 muestra una inmunotransferencia Western de proteínas de *E. canis* mediante el uso de sueros de perros de una mezcla de cuatro animales vacunados. La dilución del suero es 1:100.

La Figura 5 muestra una inmunotransferencia western de proteínas de *E. canis* mediante el uso de plasma de perros de una mezcla de animales infectados. La dilución del suero es 1:1000.

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

La Figura 7 demuestra que el antígeno p16 clonado se reconoce por sueros de perros infectados con *E. canis* pero no de aquellos que se vacunaron (se muestra como "sueros retados"). Los lisados de bacterias no inducidas (U) o inducidas (I) transformadas con un vector que expresa el antígeno p16 o el fragmento genómico original (+C) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa para el análisis por inmunotransferencia western.

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

Las Figuras 9A-B demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* mediante el uso de un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:10 en dos perros que no se vacunaron contra *E. canis* durante un curso de tiempo de infección.

Las Figuras 10A-C demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* mediante el uso de un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:10 en tres perros que se vacunaron (coadyuvante IRBI) contra *E. canis* durante un curso de tiempo de infección.

Las Figuras 11A-C demuestran la detección de anticuerpos específicos para *E. canis* mediante el uso de un polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:10 en tres perros que se vacunaron (RIBI + coadyuvante de BCG) contra *E. canis* durante un curso de tiempo de infección.

Se describen antígenos de *Ehrlichia canis* que pueden usarse para diferenciar a los animales infectados naturalmente con *E. canis* de los animales que se vacunaron contra *E. canis*. "Vacunado" significa la administración de una composición vacunal que puede prevenir o mejorar los efectos de la infección por un patógeno al establecer o mejorar la inmunidad al patógeno. Las composiciones de las vacunas pueden comprender patógenos muertos, inactivados o atenuados o productos purificados o porciones del patógeno. La vacuna no es necesariamente 100 % efectiva.

Antes de continuar en detalle, se definirán una serie de términos. Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido" se refiere a un compuesto de una sola cadena o un complejo de dos o más cadenas de residuos de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. Las cadenas pueden tener cualquier longitud y pueden comprender una proteína de fusión. Aunque "proteína" se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término "polipéptido" como se usa en la presente descripción se refiere, por lo tanto, indistintamente a péptidos, polipéptidos, proteínas o proteínas de fusión a menos que se indique de cualquier otra manera. El término "aminoácido" se refiere a una unidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína. El término "polipéptidos" puede referirse a uno o más de un tipo de polipéptido (un conjunto de polipéptidos). "Polipéptidos" también pueden referirse a mezclas de dos o más tipos diferentes de polipéptidos (una mezcla de polipéptidos). Los términos "polipéptidos" o "polipéptido" pueden significar cada uno de ellos, además, "uno o más polipéptidos".

Los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden "aislarse". Un polipéptido aislado es un polipéptido que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias de aminoácidos flanqueantes amino y carboxilo con las que se asocia naturalmente. En particular, "un polipéptido aislado mostrado en la SEQ ID NO:22-33" significa que el polipéptido no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias de aminoácidos flanqueantes amino y carboxilo con las que se asocia naturalmente (donde el polipéptido es un polipéptido de origen natural) en una molécula de proteína de *E. canis*.

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

Como se usa en la presente descripción, un "derivado" de un polipéptido del antígeno de *E. canis*, o un antígeno o polipéptido que se "deriva de" un antígeno o polipéptido de *E. canis*, se refiere a un antígeno o polipéptido en el que la forma nativa se purificó, modificó o alteró. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a: sustituciones, modificaciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; alteraciones en el patrón de lipidación, glicosilación o fosforilación; reacciones de grupos laterales libres amino, carboxilo, o hidroxilo de los residuos de aminoácidos presentes en el polipéptido con otras moléculas orgánicas y no orgánicas; y otras modificaciones, cualquiera de las cuales puede dar lugar a cambios en la estructura primaria, secundaria o terciaria.

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

Una "infección", tal como en una infección por *E. canis*, significa que un animal se expuso a *E. canis*, independientemente de si el animal presenta síntomas clínicos de *E. canis*. Una infección natural se refiere a una exposición que se produce como resultado de uno de los métodos de transmisión natural para *E. canis*, tal como la transmisión por garrapatas. Una infección no incluye una exposición a *E. canis* mediante la vacunación.

Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna de *E. canis*" es cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no está presente en una vacuna o vacunas de *E. canis* en particular. Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna de *E. canis*" es también cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no es una porción inmunogénicamente activa de una vacuna de *E. canis*. Es decir, el polipéptido o antígeno puede estar presente en la vacuna, pero no se genera una respuesta inmunitaria contra el polipéptido o antígeno (por ejemplo, la generación de anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido o antígeno) en respuesta a la administración de la vacuna de *E. canis*. Los elementos de la(s) vacuna(s) pueden ser porciones de una vacuna de subunidades que incluye menos que la bacteria completa; estas porciones pueden sintetizarse químicamente o expresarse recombinantemente antes de convertirse en parte de la vacuna, y estas porciones pueden codificarse por uno o más vectores que expresan una composición inmunogénica *in vivo*.

Un "anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis*" se refiere a un anticuerpo que se induce como resultado de una vacunación con una vacuna de *E. canis*. Estos anticuerpos pueden ser idénticos o similares a los anticuerpos provocados como resultado de una infección natural por *E. canis*. Estos anticuerpos se mantendrán a un título suficiente y tal que proporcione un efecto protector y neutralizante contra las bacterias. Una vacuna con éxito produce un nivel medible del anticuerpo (o anticuerpos) que se induce por un componente de la vacuna de *E. canis*. Los ejemplos de antígenos de *E. canis* que provocan anticuerpos que pueden ser un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis* son p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9 (ver, patente de EE. UU. NO 6660269; 6,458,942; 6,403,780; 6,392,023), proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa (ver, publicación de patente de EE. UU. NO 20040170972), p43 (ver, patente de EE. UU. NO 6,355,777), que es la porción N-terminal de p153, una glicoproteína (ver, publicación de patente de EE. UU. NO 2004/0121433), p153, y p30-1, p30-2, p30-3, p30-4, p30-5, p30-6, p30-7, p30-8, p30-9, p30-10, p30-11, p30-12, p30-13, p30-14, p30-15, p30-16, p30-17, p30-18, p30-19, p30-20 (Ohashi y otros 2001, Infection and Immunity 69(4): 2083-91).

Una respuesta inmunitaria es el desarrollo en un organismo de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a un antígeno tal como un polipéptido. Usualmente, tal respuesta incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: producción de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos. Una respuesta inmunitaria puede detectarse mediante el uso de cualquiera de varios ensayos conocidos por los expertos en la técnica.

Polipéptidos

Las muestras biológicas de animales que se vacunaron contra *E. canis* tienen el potencial de producir un resultado positivo en una prueba para la detección de infección por *E. canis* debido a la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna. En un aspecto, en la presente descripción se describe un método para distinguir entre los animales que se infectaron con *E. canis* y los que no se infectaron con *E. canis*, independientemente de si el animal se vacunó contra *E. canis*. Los métodos incluyen poner en contacto una muestra biológica del animal con un antígeno derivado de *E. canis* que no se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta de anticuerpos del animal a una vacuna de *E. canis* particular, pero que se une específicamente a un anticuerpo que se genera en respuesta a la infección por *E. canis*.

El desarrollo de los anticuerpos contra *E. canis* en un animal contra una vacuna depende de la vacuna particular usada para vacunar al animal. La diferencia en la respuesta inmunitaria entre los animales que se vacunan contra *E. canis* y los animales que se infectan natural o experimentalmente con *E. canis* proporciona un medio para determinar si un animal se infectó natural o experimentalmente con *E. canis*, independientemente de si el animal se vacunó contra *E. canis*. Por lo tanto, mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción, los animales que se infectaron con *E. canis* pueden distinguirse de los animales que no se infectaron con *E. canis* y/o se vacunaron contra *E. canis*. Los antígenos descritos en la presente descripción, sus regiones inmunodominantes, y epítomos pueden usarse en los métodos descritos en la presente descripción. Estas composiciones pueden denominarse antígenos DIVA de *E. canis* (que diferencia animales infectados de animales vacunados). Un antígeno DIVA de *E. canis* induce una respuesta inmunitaria, por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos, en un animal que es diferente de la respuesta inmunitaria inducida en el animal por una vacuna de *E. canis* particular.

En consecuencia, la detección de la unión específica entre un antígeno DIVA de *E. canis* y un anticuerpo que no es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna particular puede indicar una infección por *E. canis* natural o experimental. La ausencia de tal unión puede indicar la ausencia de infección por *E. canis*. En adición, un segundo antígeno separado, tal como un antígeno de *E. canis* que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna contra *E. canis* particular, puede usarse para detectar anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna (en lo sucesivo denominado "antígeno vacunal de *E. canis*"). Un antígeno vacunal de *E. canis* no solo se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna contra *E. canis* particular, sino que también puede unirse específicamente a anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a la infección por *E. canis*. Si se detecta un anticuerpo específico para un antígeno de la vacuna contra *E. canis*, entonces el animal se vacunó y/o infectó. La detección de ninguno de los anticuerpos indica que no hay infección ni vacunación. Como tal, varias combinaciones de reactivos de captura separados pueden conducir a una determinación del estado de vacunación y/o infección del sujeto de prueba.

En un aspecto, un método descrito en la presente descripción incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que es una parte de la bacteria *E. canis*, pero que no es un elemento de una vacuna contra *E. canis* particular. En otro aspecto, un método descrito en la presente descripción incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que está presente en o parte de la bacteria *E. canis* y una vacuna contra *E. canis*, en donde se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno (por ejemplo, la generación de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno) en respuesta a la infección con la bacteria *E. canis*, pero no en respuesta a la administración de la vacuna contra *E. canis*. En otro aspecto, se analiza una muestra biológica de un animal para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis*, y la

presencia o ausencia de anticuerpos específicos para un antígeno de la vacuna contra *E. canis*. Después se determina que el animal no se infectó y no se vacunó al determinar la ausencia de tales anticuerpos.

En un aspecto descrito en la presente descripción, un antígeno DIVA no es un elemento de una vacuna contra *E. canis*. En otro aspecto descrito en la presente descripción, un antígeno DIVA es parte de una vacuna contra *E. canis*, pero una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la generación de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno DIVA) no se genera en respuesta a la administración de la vacuna contra *E. canis*. La vacunación o el estado de infección de un animal puede determinarse mediante la detección de si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente a uno o más antígenos de la vacuna contra *E. canis* y si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente a uno o más antígenos DIVA. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna y se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal se infectó con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación del animal. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal se vacunó contra *E. canis* y no se infectó con *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal no se infectó con *E. canis* y no se vacunó contra *E. canis*.

Un aspecto descrito en la presente descripción proporciona un método para distinguir entre los animales que (a) se infectaron con *Ehrlichia canis*; y (b) los animales que no se infectaron con *E. canis* independientemente de su estado de vacunación contra *E. canis*. El método comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con un primer polipéptido de *E. canis* purificado que no se une sustancialmente específicamente a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna contra *E. canis*; en donde el primer polipéptido de *E. canis* purificado comprende las SEQ ID NO:22-33 o sus combinaciones y detectar si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente al primer polipéptido purificado. Si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente al primer polipéptido de *E. canis* purificado, entonces el animal se infectó con *E. canis*; y si los anticuerpos en la muestra no se unen sustancialmente específicamente al primer polipéptido de *E. canis* purificado, entonces el animal no se infecta con *E. canis*.

El método puede comprender, además, determinar si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente a un segundo polipéptido de *E. canis* purificado que comprende un antígeno de la vacuna contra *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal se infectó con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación del animal. Si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal se vacunó contra *E. canis* y no se infectó con *E. canis*. Si los anticuerpos de la muestra no se unen específicamente a uno o más de los antígenos de la vacuna contra *E. canis* y no se unen específicamente a uno o más de los antígenos DIVA, entonces el animal no se infectó con *E. canis* y no se vacunó contra *E. canis*. Es posible que los anticuerpos en las muestras de prueba no se unan sustancialmente específicamente a los antígenos DIVA y/o a los antígenos vacunales de *E. canis*. Sustancialmente ninguna unión específica es una cantidad de unión que se consideraría un resultado negativo por un experto en la técnica.

Un aspecto descrito en la presente descripción proporciona un método para determinar el estado de infección y vacunación de un animal referente a *E. canis*. El método comprende:

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

(b) detectar si los anticuerpos en la muestra se unen específicamente al primer y segundo polipéptidos purificados;

en donde si los anticuerpos en la muestra biológica se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal se infectó con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación contra *E. canis*; en donde si los anticuerpos en la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal no se infectó con *E. canis* y se vacunó contra *E. canis*; y en donde si los anticuerpos en la muestra no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos purificados, entonces el animal no se vacunó contra *E. canis* y no se infectó por *E. canis*.

La Tabla 1 demuestra el estado de infección y/o vacunación de los animales que puede determinarse con los antígenos DIVA de *E. canis* y los antígenos vacunales de *E. canis*. "No realizado" en la Tabla 1 significa que no se terminó una prueba particular y, por lo tanto, no hay ningún resultado disponible. Por ejemplo, si una muestra biológica de un animal se analiza con un antígeno DIVA de *E. canis* y el resultado es positivo y no se termina ninguna prueba con un antígeno vacunal de *E. canis*, entonces el estado del animal sería infectado, pero se desconoce el estado de la vacunación.

Tabla 1.

Estado de infección/vacunación del animal	Resultado con el antígeno DIVA de <i>E. canis</i>	Resultado con el antígeno vacunal de <i>E. canis</i> *
Infectado, estado de vacunación desconocido	Positivo	No realizado
Infectado, estado de vacunación desconocido	Positivo	Positivo
Vacunado, no infectado	Negativo	Positivo
Vacunado y/o infectado	No realizado	Positivo
No infectado, no vacunado	Negativo	Negativo
No infectado, estado de vacunación desconocido	Negativo	No realizado
No vacunado, no infectado	No realizado	Negativo

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

Otro aspecto descrito en la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno, en una muestra de prueba, en donde el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se une específicamente a un polipéptido purificado que consiste de las SEQ ID NO:10, 22-33 o sus combinaciones. El método comprende poner en contacto la muestra de prueba con un polipéptido purificado que comprende las SEQ ID NO:10, 22-33 o sus combinaciones en condiciones adecuadas para la unión específica del polipéptido purificado al anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno; y detectar la presencia o ausencia de unión específica. La presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, y la ausencia de unión específica indica la ausencia del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno.

Las vacunas pueden no ser completamente efectivas para prevenir o mejorar de la infección. Por lo tanto, es conveniente tener un método para determinar si un animal vacunado se infectó a pesar de la vacunación. Las SEQ ID NO:10, 22-33 no detecta anticuerpos anti-*E. canis* en perros que se vacunaron contra *E. canis* y que no se infectaron con *E. canis*. Las SEQ ID NO:10, 22-33 puede usarse para detectar la infección por *E. canis* en perros que recibieron o no una vacuna contra *E. canis*. El animal puede infectarse con *E. canis* después de recibir una vacuna contra *E. canis* y la detección de *E. canis* aún es posible.

Otro aspecto descrito en la presente descripción comprende una composición que comprende o que consiste de uno o más polipéptidos purificados que comprenden o que consisten en las SEQ ID NO:10, 22-33 o sus combinaciones. Un polipéptido descrito en la presente descripción puede modificarse postraduccionalmente. Un polipéptido purificado es una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, otros tipos de polipéptidos, precursores químicos, químicos usados en la síntesis del polipéptido, o sus combinaciones. Una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, sustancias químicas usadas en la síntesis del polipéptido, etc., tiene menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 % o más de otros polipéptidos, medio de cultivo, sustancias químicas precursoras y/u otras sustancias químicas usadas en la síntesis. Por lo tanto, un polipéptido purificado es aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más puro. Un polipéptido purificado no incluye extractos celulares o mezclas de polipéptidos no purificados o semipurificados que son menos del 70 % puros.

En la presente descripción se describe un polipéptido purificado que comprende las SEQ ID NO:22-33, en donde el polipéptido consiste en menos de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o menos (o cualquier intervalo entre 50 y 6) aminoácidos de *Ehrlichia canis* contiguos de origen natural (es decir, el polipéptido purificado no abarca el polipéptido de *Ehrlichia canis* completo de origen natural). Los aminoácidos de *Ehrlichia canis* de origen natural son cualquier polipéptido producido naturalmente por un organismo *Ehrlichia canis*. Un polipéptido purificado puede comprender las SEQ ID NO:22-33, en donde el polipéptido comprende más de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más aminoácidos de *Ehrlichia canis* contiguos de origen natural (o cualquier intervalo entre aproximadamente 6 y 100 aminoácidos).

El hecho de que los polipéptidos de SEQ ID NO:22-33 sean más pequeños que un polipéptido de *Ehrlichia canis* de longitud completa es importante porque los polipéptidos más pequeños pueden tener mayor especificidad y/o sensibilidad que los polipéptidos de longitud completa en ensayos de detección. Adicionalmente, estos polipéptidos más pequeños pueden ser menos costosos de fabricar, y pueden obtenerse a una mayor pureza que el polipéptido de longitud completa.

En la presente descripción se describe un polipéptido purificado que tiene menos de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6 aminoácidos de *Ehrlichia canis* de origen natural contiguos y más de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO:22-23 (o cualquier intervalo entre 6 y 100 aminoácidos). Por lo tanto, un polipéptido descrito en la presente descripción puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30; de aproximadamente 15 a aproximadamente 50; o de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

Las variantes de polipéptidos son al menos aproximadamente 79 %, 80 %, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o más idénticas a las secuencias de polipéptidos mostradas en las SEQ ID NO:22-33. Las variantes de polipéptidos tienen una o más variaciones de aminoácidos conservadoras u otras modificaciones menores y retienen la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo salvaje correspondiente. Un polipéptido puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o menos sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Estos polipéptidos pueden tener residuos de aminoácidos adicionales más allá de los de las SEQ ID NO:22-33. Es decir, los polipéptidos pueden tener residuos de aminoácidos adicionales adicionados al extremo 5' o 3' de los polipéptidos, mientras que la identidad de la secuencia a lo largo de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 48 aminoácidos contiguos (en dependencia de la longitud de la SEQ ID NO específica) de las SEQ ID NO:22-33 es de al menos aproximadamente 95 %. Los aminoácidos adicionales adicionados al extremo 5' o 3' de los polipéptidos no se consideran que afectan al porcentaje de identidad de la secuencia. Los aminoácidos adicionales pueden ser aquellos de origen natural o pueden ser aminoácidos de origen no natural. Los polipéptidos pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 o aproximadamente 75 aminoácidos de longitud.

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

La identidad de secuencia porcentual tiene un significado reconocido en la técnica y hay una serie de métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Ver, por ejemplo, Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Parte I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); y Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991). Los métodos para alinear polinucleótidos o polipéptidos se codifican en programas de computadora, que incluyen el paquete de programas GCG (Devereux y otros, Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul y otros, J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), y programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, el programa de computadora ALIGN que emplea el algoritmo FASTA puede usarse, con una búsqueda de interrupción afín con una penalización de interrupción abierta de -12 y una penalización de extensión de interrupción de -2.

Cuando se usa cualquiera de los programas de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, aproximadamente 95 % idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcula a lo largo de la longitud completa del polinucleótido o polipéptido de referencia y que se permiten interrupciones en la identidad de hasta el 5 % del número total de nucleótidos o aminoácidos en el polinucleótido de referencia.

Los polipéptidos variantes generalmente pueden identificarse mediante la modificación de una de las secuencias de polipéptidos descritas en la presente descripción, y la evaluación de las propiedades del polipéptido modificado para determinar si es un equivalente biológico. Una variante es un equivalente biológico si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido descrito en la presente descripción en un ensayo tal como un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunoenzima o un ensayo de inmunotransferencia western, por ejemplo, tiene 90-110 % de la actividad del polipéptido original. El ensayo puede ser un ensayo de competencia en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido descrito en la presente descripción a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente por aproximadamente 80, 95, 99, o 100 %. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de tipo salvaje correspondiente también se une específicamente a la variante de polipéptido.

Una sustitución conservadora es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantuvieran sustancialmente sin cambios. En general, los siguientes

grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gli, glu, sap, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

- 5 Un polipéptido descrito en la presente descripción puede comprender además una secuencia señal (o líder) que dirige la transferencia de la proteína de manera cotraduccional o postraduccional. El polipéptido puede comprender además un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse a una región Fc de inmunoglobulina o albúmina sérica bovina.
- 10 Un polipéptido puede unirse de manera covalente o no covalente a una secuencia de aminoácidos a la que el polipéptido no se asocia normalmente en la naturaleza, es decir, una secuencia de aminoácidos heterólogos. Una secuencia de aminoácidos heterólogos puede ser de un organismo diferente de *E. canis*, una secuencia sintética, o una secuencia de *E. canis* no localizada en el carboxilo o amino terminal de un polipéptido descrito en la presente descripción en la naturaleza. Adicionalmente, un polipéptido puede unirse de manera covalente o no covalente a
- 15 compuestos o moléculas que no sean aminoácidos tales como reactivos indicadores. Un polipéptido puede unirse de manera covalente o no covalente a un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones. Un polipéptido también puede unirse a un resto (es decir, un grupo funcional que puede ser un polipéptido u otro compuesto) que mejora una respuesta inmunitaria (por ejemplo, citocinas tales como IL-2), un resto que facilita la purificación (por ejemplo, etiquetas de afinidad tales como una
- 20 etiqueta de seis histidinas, trpE, glutatión, proteína de unión a maltosa), o un resto que facilita la estabilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol; grupos protectores de amino terminal tales como acetilo, propilo, succinilo, bencilo, benciloxicarbonilo o t-butiloxicarbonilo; grupos que protegen el extremo carboxilo tales como amida, metilamida, y etilamida). Un ligando de purificación de proteínas puede ser uno o más residuos de aminoácidos C en, por ejemplo, el extremo amino o extremo carboxilo o ambos extremos de un polipéptido descrito en la presente
- 25 descripción. Un separador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que no se asocian con un polipéptido descrito en la presente descripción en la naturaleza. Un separador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100, o 1000 aminoácidos.
- 30 Si se desea, un polipéptido descrito en la presente descripción puede ser parte de una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como enlazadores de aminoácidos, separadores de aminoácidos, secuencias de señales, secuencias de transferencia de parada de TMR, dominios de transmembrana, así como también ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, proteína A de estafilococo, o sus combinaciones. Más de un polipéptido descrito en la presente descripción
- 35 puede estar presente en una proteína de fusión. Los fragmentos de polipéptidos descritos en la presente descripción pueden estar presentes en una proteína de fusión descrita en la presente descripción. Un polipéptido descrito en la presente descripción puede unirse operativamente a proteínas que no son de *Ehrlichia canis* o proteínas p16 de que no son de *Ehrlichia canis* para formar proteínas de fusión. Una proteína de fusión descrita en la presente descripción puede comprender uno o más polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
- 40 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o sus fragmentos, o sus combinaciones. Una proteína de fusión no se produce en la naturaleza. El término "unido operativamente" significa que el polipéptido descrito en la presente descripción y los otros polipéptidos se fusionan entre sí en marco ya sea al extremo N o al extremo C del polipéptido descrito en la presente descripción.
- 45 Los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden estar en una forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o una de sus combinaciones. Un polipéptido multimérico puede ser un péptido antígeno múltiple (MAP). Ver, por ejemplo, Tam, J. Immunol. Methods, 196:17-32 (1996).
- 50 Los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden comprender un antígeno que se reconoce por un anticuerpo específico para *E. canis*. El antígeno puede comprender uno o más epítopos (es decir, determinantes antigénicos). Un epítipo puede ser un epítipo lineal, un epítipo secuencial o un epítipo conformacional. Los epítopos dentro de un polipéptido descrito en la presente descripción pueden identificarse por varios métodos. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 4,554,101; Jameson & Wolf, CABIOS 4:181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido
- 55 descrito en la presente descripción puede aislarse y cribarse. Una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan una secuencia completa de polipéptidos, pueden prepararse mediante escisión proteolítica. Al comenzar con, por ejemplo, fragmentos de polipéptido de 30 mer (o fragmentos más pequeños), cada fragmento puede probarse para detectar la presencia de epítopos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un ensayo ELISA un polipéptido de *E. canis*, tal como un fragmento de polipéptido de 30 mer, se une a un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa plástica
- 60 de pocillos múltiples. Se marca una población de anticuerpos, se adiciona al soporte sólido y se permite que se una al antígeno no marcado, en condiciones en las que se bloquea la absorción no específica, y se elimina cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas. La unión de anticuerpos se detecta, por ejemplo, mediante una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. Después, pueden probarse fragmentos progresivamente más pequeños y solapados a partir de 30 mer identificados para mapear el epítipo de interés.
- 65

Un antígeno DIVA puede comprender un epítipo o región inmunodominante. Es decir, un epítipo o región que más frecuentemente induce y se une a los anticuerpos en una población de estos en comparación con otros epítipos. Un antígeno puede tener uno o más epítipos inmunodominantes. Los epítipos inmunodominantes pueden mapearse en, por ejemplo, un polipéptido después de que el polipéptido se administra a un animal o antes de tal administración. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2004/0209324.

Un polipéptido descrito en la presente descripción puede producirse recombinantemente. Un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente descripción puede introducirse en un vector de expresión recombinante, que puede expresarse en un sistema de células hospederas de expresión adecuado mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos están disponibles en la técnica y puede usarse cualquiera de tales sistema de expresión. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido puede traducirse en un sistema de traducción libre de células. Un polipéptido también puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de células de *E. canis*.

Un polipéptido inmunogénico descrito en la presente descripción puede comprender una secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o sus fragmentos. Un polipéptido inmunogénico puede provocar anticuerpos u otras respuestas inmunitarias (por ejemplo, las respuestas de los linfocitos T del sistema inmunitario) que reconocen epítipos de un polipéptido que tienen las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, o 33.

Un polipéptido inmunogénico descrito en la presente descripción también puede ser un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, o 33. Un fragmento de polipéptido inmunogénico descrito en la presente descripción puede ser de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o menos (o cualquier intervalo entre aproximadamente 50 y aproximadamente 6) aminoácidos de longitud. Un fragmento de polipéptido inmunogénico descrito en la presente descripción puede ser de más de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más aminoácidos de longitud (o cualquier intervalo entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100 aminoácidos).

Los anticuerpos específicos para *E. canis* pueden detectarse en fluidos biológicos o tejidos mediante cualquier método conocido en la técnica mediante el uso de los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los métodos más simples generalmente son los métodos de inmunoensayo. Un método de este tipo es un método basado en la competencia en donde las muestras de suero se incuban previamente con un antígeno de *E. canis* que no es un elemento de una vacuna contra *E. canis* (por ejemplo, un antígeno DIVA de *E. canis*), y después se adicionan a una fase sólida, tal como una placa de microtitulación, que tiene un anticuerpo monoclonal inmovilizado específico para el antígeno DIVA de *E. canis*. Los anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis* en la muestra evitarán que el antígeno DIVA de *E. canis* se una al anticuerpo inmovilizado. La detección de cualquier unión del antígeno DIVA de *E. canis* al anticuerpo inmovilizado puede determinarse mediante la adición de un segundo socio de unión para el antígeno de *E. canis*, ya sea directamente marcado o capaz de marcarse a través de la unión a otro socio de unión que tiene una etiqueta. Una muestra positiva, es decir, una muestra que tiene anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis*, se asocia con una disminución de la señal de la etiqueta.

Los anticuerpos contra un antígeno DIVA de *E. canis* en una muestra biológica pueden detectarse al poner en contacto la muestra con un antígeno DIVA de *E. canis* y adicionar la muestra a una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti antígeno DIVA. La unión del antígeno DIVA a la placa de microtitulación puede detectarse mediante la adición de un anticuerpo policlonal de conejo contra el antígeno DIVA y la adición de un anticuerpo policlonal de burro anticonejo conjugado con HRP. Los anticuerpos de la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA al anticuerpo inmovilizado, lo que provocará una disminución de la señal.

Otro método para detectar anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* es un ensayo tipo sándwich donde una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se pone en contacto con un antígeno DIVA de *E. canis* inmovilizado para formar un complejo inmunológico. La presencia de un anticuerpo específico para un antígeno de DIVA de *E. canis* se determina mediante la detección de la unión de un socio de unión marcado para el anticuerpo de *E. canis*, tal como un segundo anticuerpo.

En un aspecto descrito en la presente descripción, los antígenos DIVA de *E. canis* pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido adecuado. Una muestra biológica se pone en contacto con el antígeno DIVA de *E. canis*, al que se unen los anticuerpos anti-*E. canis*, si tales anticuerpos están presentes en la muestra. La unión puede detectarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, enzimas, radionúclidos, partículas o etiquetas fluorescentes. El reactivo de detección puede asociarse con una proteína que es la misma o similar a la que se usa para capturar anticuerpos anti-*E. canis* (si están presentes). Los anticuerpos contra *E. canis* pueden detectarse mediante la inmovilización de un antígeno de *E. canis* en un soporte sólido. Las muestras biológicas pueden ponerse en contacto con el soporte sólido y, después de la eliminación de la muestra no unida, la unión de los anticuerpos *E. canis* al antígeno puede lograrse con, por ejemplo, un anticuerpo IgG marcado.

Los antígenos de DIVA descritos en la presente descripción pueden comprender además mimitopos de antígenos DIVA descritos en la presente descripción. Un mimitopo es un epítipo de péptido aleatorio que imita un epítipo antigénico natural durante la presentación del epítipo. Los epítipos de péptidos aleatorios pueden identificarse mediante la generación o selección de una biblioteca de epítipos de péptidos aleatorios. La biblioteca se pone en contacto con un anticuerpo. Los mimitopos que se identifican son específicamente inmunorreactivos con el anticuerpo. Las bibliotecas de péptidos aleatorias pueden, por ejemplo, mostrarse en fagos o generarse como bibliotecas combinatorias.

Los antígenos DIVA de *E. canis*, por ejemplo, polipéptidos, pueden ser naturales, es decir, aislados de una fuente natural, o pueden ser sintéticos (es decir, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante mediante el uso de técnicas de ingeniería genética). Las proteínas naturales pueden aislarse de la bacteria completa mediante técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad. Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden usarse para preparar una columna de afinidad adecuada mediante técnicas bien conocidas.

Las proteínas que son inmunológicamente reactivas de forma cruzada con una proteína de *E. canis* natural pueden sintetizarse químicamente. Por ejemplo, los polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más usualmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y típicamente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, pueden sintetizarse mediante el conocido método de síntesis en fase sólida de Merrifield donde los aminoácidos se adicionan secuencialmente a una cadena en crecimiento. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156). También pueden usarse proteínas recombinantes. Estas proteínas pueden producirse mediante la expresión en células cultivadas de moléculas de ADN recombinante que codifican una porción deseada del genoma de *E. canis*. La porción del genoma de *E. canis* puede ser natural o sintética, con genes naturales que pueden obtenerse de la bacteria aislada mediante técnicas convencionales.

Polinucleótidos de *E. canis*

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción contienen menos de un genoma microbiano completo y pueden ser ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o sus combinaciones. Los polinucleótidos pueden purificarse sin otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede purificarse al 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos y millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro, por ejemplo, de bibliotecas genómicas o de ADNc, o cortes de gel que contienen un preparado de ADN genómico hidrolizado enzimáticamente no deben considerarse un polinucleótido aislado. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción codifican los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los polinucleótidos pueden codificar los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, sus fragmentos, o sus combinaciones. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden consistir en menos de aproximadamente 200, 120, 100, 90, 75, 60, 57, 54, 45 (o cualquier intervalo entre 200 y 45) polinucleótidos de *Ehrlichia canis* contiguos, de origen natural. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden consistir en más de aproximadamente 45, 54, 57, 60, 75, 90, 100, 120, 150, 200, (o cualquier intervalo entre 45 y 200), o más polinucleótidos de *Ehrlichia canis* contiguos, de origen natural. Los polinucleótidos purificados pueden comprender nucleótidos heterólogos adicionales (es decir, nucleótidos que no son de *Ehrlichia canis*) e incluso aminoácidos adicionales de *Ehrlichia canis* siempre que no aparezcan naturalmente de forma contigua con los polinucleótidos p16 de *Ehrlichia canis* u otros polinucleótidos descritos en la presente descripción. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican para enlazadores, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada de TMR, dominios de transmembrana, o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y proteína A de estafilococo.

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden aislarse. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido de origen natural que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' con las que se asocia de forma natural. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre y cuando se eliminen o estén ausentes las secuencias de ácido nucleico que naturalmente flanquean de manera inmediata la molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural. Los polinucleótidos aislados también incluyen moléculas de ácido nucleico de origen no natural. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos y millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro, por ejemplo, de bibliotecas genómicas o de ADNc, o cortes de gel que contienen un preparado de ADN genómico hidrolizado enzimáticamente no deben considerarse un polinucleótido aislado. La secuencia de nucleótidos completa para *E. canis* está disponible en, por ejemplo, GenBank como número de acceso de NCBI: NZ_AAEJ01000001.

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden comprender además fragmentos que codifican polipéptidos inmunogénicos. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden codificar polipéptidos de longitud completa, fragmentos de polipéptidos y variantes de polipéptidos o polipéptidos de fusión.

Las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican polipéptidos descritos en la presente descripción, así como también las secuencias de nucleótidos homólogas que son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90,

96, 98, o 99 % idénticas a las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción y sus complementos son también polinucleótidos descritos en la presente descripción. La identidad de secuencia en por ciento puede calcularse como se describió en la sección "Polipéptidos". Las secuencias de nucleótidos degeneradas son polinucleótidos que codifican un polipéptido descrito en la presente descripción o sus fragmentos, pero difieren en la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), los homólogos de especies, y las variantes de los polinucleótidos de *E. canis* que codifican polipéptidos de *E. canis* biológicamente funcionales también son polinucleótidos de *E. canis*. Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden aislarse a partir de secuencias de ácidos nucleicos presentes en, por ejemplo, una muestra biológica, tal como sangre, suero, saliva o tejido de un individuo infectado. Los polinucleótidos también pueden sintetizarse en el laboratorio, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automático. Un método de amplificación tal como PCR puede usarse para amplificar polinucleótidos de ADN genómico o ADNc que codifica los polipéptidos.

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden comprender secuencias codificantes para polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no son de origen natural. Si es conveniente, los polinucleótidos pueden clonarse en un vector de expresión que comprende elementos de control de la expresión, que incluyen, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, potenciadores u otros elementos reguladores que impulsan la expresión de los polinucleótidos descritos en la presente descripción en células hospederas. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC, o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector de adenovirus de tipo 2 o un vector de tipo 5. Opcionalmente, pueden usarse otros vectores, que incluyen pero no se limitan al virus Sindbis, virus de simios 40, vectores de alfavirus, vectores de poxvirus y vectores de citomegalovirus y retrovíricos, tales como el virus del sarcoma murino, virus del tumor de mama de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney y virus del sarcoma de Rous. Los minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagamidos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas de virus, partículas similares a virus, cósmidos (plásmidos en los que se insertaron sitios cos de fagos lambda) y replicones (elementos genéticos que son capaces de replicarse bajo su propio control en una célula) también pueden usarse.

Los métodos para preparar polinucleótidos unidos operativamente a una secuencia de control de expresión y expresarlos en una célula hospedera se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 4,366,246. Un polinucleótido descrito en la presente descripción se une operativamente cuando se posiciona adyacente a o cerca de uno o más elementos de control de la expresión, que dirigen la transcripción y/o traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden usarse, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo, cebadores de PCR, para detectar la presencia de polinucleótidos de *E. canis* en una muestra de prueba, tal como una muestra biológica. Las sondas son moléculas capaces de interactuar con un ácido nucleico diana, típicamente de una manera específica de secuencia, por ejemplo, a través de hibridación. Los cebadores son un subconjunto de sondas que pueden soportar una manipulación enzimática y que pueden hibridarse con un ácido nucleico diana de manera que ocurra la manipulación enzimática. Un cebador puede fabricarse a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados de nucleótidos o análogos disponibles en la técnica que no interfieren con la manipulación enzimática.

Una sonda o cebador puede ser aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos contiguos que codifican polipéptidos mostrados en, por ejemplo, las SEQ ID NO:22-33.

La hibridación de ácidos nucleicos se entiende bien en la técnica. Típicamente, una sonda puede fabricarse a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados de nucleótidos o análogos disponibles en la técnica. La capacidad de tales sondas y cebadores para hibridarse específicamente con las secuencias de polinucleótidos de *E. canis* les permitirá ser de uso en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra de prueba dada. Las sondas de polinucleótidos y los cebadores descritos en la presente descripción pueden hibridarse a secuencias complementarias en una muestra de prueba tal como una muestra biológica, que incluye saliva, esputo, sangre, plasma, suero, orina, heces fecales, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los polinucleótidos de la muestra pueden someterse, por ejemplo, a electroforesis en gel u otras técnicas de separación por tamaño o pueden inmovilizarse sin separación por tamaño. Las sondas de polinucleótidos o los cebadores pueden etiquetarse. Las etiquetas adecuadas, y los métodos para etiquetar sondas y cebadores se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, etiquetas radiactivas incorporadas por traducción de mella o por cinasa, etiquetas de biotina, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes, etiquetas de quelantes de metal y etiquetas enzimáticas. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con las sondas o cebadores en condiciones de hibridación estrictas adecuadas.

En dependencia de la aplicación, pueden usarse condiciones variables de hibridación para lograr diversos grados de selectividad de la sonda o el cebador hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, pueden usarse condiciones relativamente estrictas, tales como condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por una concentración de sal de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M de sal a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Para aplicaciones que requieren menos selectividad, pueden usarse condiciones de hibridación menos estrictas. Por ejemplo, las condiciones de sal de

aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o el cebador y un polinucleótido complementario a partir de la muestra de prueba indica la presencia de *E. canis* o un polinucleótido de *E. canis* en la muestra.

5

Anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente descripción son moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de *E. canis* descrito en la presente descripción, variantes de polipéptidos descritos en la presente descripción, o sus fragmentos. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser específico para un polipéptido de *Ehrlichia canis*, por ejemplo, un anticuerpo específico para una o más de las SEQ ID NO:10, 22-33. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única (scFv), o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos son la porción de unión al antígeno de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable de un anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv.

10

15

20

25

30

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser cualquier clase de anticuerpo, que incluye, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo o su fragmento se une a un epítipo de un polipéptido descrito en la presente descripción. Un anticuerpo puede producirse *in vivo* en animales de laboratorio adecuados o *in vitro* mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998); Dean, *Methods Mol. Biol.* 32:361-79 (1994); Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994); Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994); Drenckhahn y otros *Methods Cell Biol.* 37:7-56 (1993); Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239-65 (1992); Wright y otros *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992). Por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden producirse al administrar un polipéptido descrito en la presente descripción a un animal, tal como un humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobaya, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro o caballo. El suero del animal inmunizado se recolecta y los anticuerpos se purifican del plasma por, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos policlonales se conocen en la técnica.

35

40

45

“Se une específicamente” o “es específico para” significa que un primer antígeno, por ejemplo, un polipéptido de *E. canis*, reconoce y se une a un anticuerpo descrito en la presente descripción con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. “Se une específicamente” o “es específico para” también significa que un primer anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo inducido contra las SEQ ID NO:22-33, reconoce y se une a las SEQ ID NO:22-33, con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. Una molécula no específica es un antígeno que no comparte ningún epítipo común con el primer antígeno. Una molécula no específica puede no derivarse de *Ehrlichia sp.*, y en particular puede no derivarse de *Ehrlichia chaffeensis* o *Ehrlichia canis*. “*Ehrlichia sp.*” se refiere a todas las especies del género *Ehrlichia*. Por ejemplo, un anticuerpo inducido contra un primer antígeno (por ejemplo, un polipéptido) al que se une más eficientemente que a un antígeno no específico puede describirse como una unión específica al primer antígeno. Un anticuerpo o su porción de unión al antígeno descrita en la presente descripción puede unirse específicamente a un polipéptido de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o sus fragmentos cuando se une con una afinidad de unión K_a de 10^7 1/mol o más. La unión específica puede probarse mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunotransferencia western mediante el uso de una metodología bien conocida en la técnica.

50

55

Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que (a) compiten con un anticuerpo de referencia para unirse a las SEQ ID NO:22-33 o sus fragmentos de unión al antígeno; (b) se unen al mismo epítipo de las SEQ ID NO:22-33 o sus fragmentos de unión al antígeno como un anticuerpo de referencia; (c) se unen a las SEQ ID NO:22-33 o sus fragmentos de unión al antígeno con sustancialmente la misma K_a que un anticuerpo de referencia; y/o (d) se unen a las SEQ ID NO:22-33 o sus fragmentos con sustancialmente la misma velocidad de disociación que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a un polipéptido de las SEQ ID NO:22-33 o sus fragmentos de unión al antígeno con una afinidad de unión K_a de 10^7 1/mol o más.

60

65

Adicionalmente, también pueden producirse fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos presentes en un polipéptido descrito en la presente descripción. Por ejemplo, los linfocitos B normales de un mamífero, tal como un ratón, que se inmunizó con un polipéptido descrito en la presente descripción pueden fusionarse con, por ejemplo, células de mieloma de ratón sensibles a HAT para producir hibridomas. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos contra *E. canis* pueden identificarse mediante el uso de RIA o ELISA y aislarse mediante clonación en agar semisólido o mediante dilución limitante. Los clones que producen los anticuerpos específicos contra *E. canis* se aíslan mediante otra ronda de cribado. Los anticuerpos monoclonales pueden cribarse para determinar la especificidad mediante el uso de técnicas estándar, por ejemplo, al unir un polipéptido descrito en la presente descripción a una placa de microtitulación y medir la unión del anticuerpo monoclonal mediante un ensayo ELISA. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal pueden prepararse directamente, mediante la

selección de la fusión inicial, o preparados secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente mediante el uso de una técnica de selección sib para aislar variantes de conmutación de clase. Ver Steplewski y otros, P.N.A.S. U.S.A. 82:8653 1985; Spria y otros, J. Immunolog. Meth. 74:307, 1984. Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente descripción también pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 4,474,893; patente de Estados Unidos NO 4,816,567. Los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden construirse químicamente. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 4,676,980.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser quiméricos (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 5,482,856), humanizados (ver, por ejemplo, Jones y otros, Nature 321:522 (1986); Reichmann y otros, Nature 332:323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593 (1992)), o anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse, por ejemplo, mediante inmortalización directa, visualización en fagos, ratones transgénicos o una metodología Trimera, ver, por ejemplo, Reisener y otros, Trends Biotechnol. 16:242-246 (1998).

Los anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos de *E. canis* (por ejemplo, los polipéptidos de *E. canis* mostrados en las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33), son particularmente útiles para detectar la presencia de *E. canis* o antígenos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra de suero, sangre, plasma, heces fecales, células, tejidos, orina o saliva de un animal infectado con *E. canis* tal como un ser humano o un perro. Un inmunoensayo para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoensayo para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede usar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de *E. canis*, una combinación de anticuerpos monoclonales específicos para epítipos de un polipéptido de *E. canis*, anticuerpos monoclonales específicos para epítipos de diferentes polipéptidos de *E. canis*, anticuerpos policlonales específicos para el mismo antígeno de *E. canis*, anticuerpos policlonales específicos para diferentes antígenos de *E. canis* o una combinación de anticuerpos monoclonales. Los protocolos de inmunoensayo pueden basarse en, por ejemplo, ensayos de competencia, reacción directa o tipo sándwich que usan, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden etiquetarse con cualquier tipo de etiqueta conocida en la técnica, que incluye, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, metálicas coloidales, de radioisótopos y bioluminiscentes.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción o sus fragmentos de unión al antígeno pueden unirse a un soporte y usarse para detectar la presencia de *E. canis* o un antígeno de *E. canis*, por ejemplo, un antígeno DIVA de *E. canis* o un antígeno vacunal contra *E. canis*. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosa natural y modificada, poliacrilamidas, agarosa y magletita.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse además para aislar organismos *E. canis* o antígenos de *E. canis* por columnas de inmunoafinidad. Los anticuerpos pueden fijarse a un soporte sólido mediante, por ejemplo, adsorción o por enlace covalente de manera que los anticuerpos mantengan su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, los grupos separadores pueden incluirse de manera tal que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo aún sea accesible. Los anticuerpos inmovilizados pueden usarse para unirse a los organismos *E. canis* o a los antígenos de *E. canis* de una muestra, tal como una muestra biológica que incluye saliva, suero, esputo, sangre, orina, heces fecales, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los organismos *E. canis* o los antígenos de *E. canis* unidos se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, mediante un cambio en el pH.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden usarse en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y distribución de un polipéptido descrito en la presente descripción durante varios eventos celulares o condiciones fisiológicas. Los anticuerpos también pueden usarse para identificar moléculas implicadas en la inmunización pasiva e identificar moléculas implicadas en la biosíntesis de antígenos no proteicos. La identificación de tales moléculas puede ser útil en el desarrollo de vacunas. Los anticuerpos descritos en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena única, pueden usarse para monitorear el curso de mejora de una enfermedad causada por *E. canis*. Mediante la medición del aumento o disminución de los anticuerpos contra *E. canis* específicos para los antígenos de *E. canis* en una muestra de prueba de un animal, puede determinarse si un régimen terapéutico particular destinado a mejorar el trastorno es efectivo. Los anticuerpos pueden detectarse y/o cuantificarse mediante el uso, por ejemplo, de ensayos de unión directa tales como RIA, ELISA o ensayos de inmunodetección por transferencia western.

Detección

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno específicos para antígenos de *Ehrlichia canis* o polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba, tal como una muestra biológica, una muestra ambiental, o una muestra de laboratorio. Una muestra de prueba puede comprender potencialmente polinucleótidos de *Ehrlichia sp.*, polinucleótidos de *Ehrlichia canis*, polipéptidos de *Ehrlichia sp.*, polipéptidos de *Ehrlichia canis*, anticuerpos específicos para *Ehrlichia sp.*, y/o anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis*, polinucleótidos no relacionados y polipéptidos, sus combinaciones, o ninguno de los anteriores. Una muestra biológica puede incluir, por ejemplo, sueros, sangre, células, plasma, saliva,

orina, heces fecales, o tejido de un mamífero tal como un caballo, gato, perro o ser humano. La muestra de prueba puede ser no tratada, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada, o purificada.

5 Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender poner en contacto uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción con una muestra de prueba en condiciones que permiten la formación de complejos polipéptidos/anticuerpos, es decir, inmunocomplejos. Es decir, los polipéptidos descritos en la presente descripción se unen específicamente a los anticuerpos específicos para los antígenos de *Ehrlichia canis* ubicados en la muestra. Uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción pueden unirse específicamente a anticuerpos que son específicos para los antígenos de *Ehrlichia canis* y pueden no unirse específicamente a antígenos de otros patógenos, tales como, por ejemplo, antígenos de *Ehrlichia chaffeensis*. Un experto en la técnica está familiarizado con ensayos y condiciones que se usan para detectar la unión del complejo anticuerpo/polipéptido. Se detecta la formación de un complejo entre polipéptidos y anticuerpos en la muestra. La formación de complejos de anticuerpo/polipéptido es una indicación de que los polipéptidos de *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra. La falta de detección de los complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que los polipéptidos de *Ehrlichia canis* no están presentes en la muestra.

20 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse en un método de detección de antígenos de *Ehrlichia canis* al obtener una muestra de prueba de, por ejemplo, un ser humano o animal sospechoso de tener una infección por *Ehrlichia canis*. La muestra de prueba se pone en contacto con los anticuerpos descritos en la presente descripción en condiciones que permiten la formación de complejos anticuerpo-antígeno (es decir, inmunocomplejos). Un experto en la técnica es consciente de las condiciones que permiten y son apropiadas para la formación de complejos antígeno/anticuerpo. La cantidad de complejos anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante la metodología conocida en la técnica. Un nivel que es mayor que el que se forma en una muestra de control negativo indica la presencia de antígenos de *Ehrlichia canis*. Una muestra de control negativo es una muestra que no comprende ningún polipéptido de *Ehrlichia canis*. El control negativo puede contener polipéptidos de *Ehrlichia sp.* Un anticuerpo puede ser específico para los antígenos de *Ehrlichia canis* y puede no ser específico para los antígenos de otros patógenos, tales como, por ejemplo, los antígenos de *Ehrlichia chaffeensis*. Alternativamente, un polipéptido descrito en la presente descripción puede ponerse en contacto con una muestra de prueba. Los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba positiva formarán complejos antígeno-anticuerpo en condiciones adecuadas. La cantidad de complejos anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica.

35 La infección por *Ehrlichia canis* puede detectarse en un sujeto. Se obtiene una muestra biológica del sujeto. Uno o más polipéptidos purificados que comprenden la SEQ ID NO:22-33 u otros polipéptidos descritos en la presente descripción se ponen en contacto con la muestra biológica en condiciones que permiten que se formen complejos polipéptidos/anticuerpos. Se detectan los complejos polipéptidos/anticuerpos. La detección de los complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* están presentes. La falta de detección de los complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero no tiene anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis*.

40 Los anticuerpos para *Ehrlichia canis* detectados por un inmunoensayo descrito en la presente descripción pueden ser IgG, IgM, IgA, IgD o IgE. Los anticuerpos usados para detectar los antígenos de *Ehrlichia canis* pueden ser IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

45 La infección por *Ehrlichia canis* puede detectarse en un sujeto en unos 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días o más después de que el sujeto adquirió la infección por *Ehrlichia canis*. La infección por *Ehrlichia canis* puede detectarse en un sujeto en unos 21 días, 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días o menos después de que el sujeto adquirió la infección por *Ehrlichia canis*.

50 El complejo polipéptido/anticuerpo puede detectarse cuando un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático, que se une al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal puede aplicarse al complejo polipéptido/anticuerpo en condiciones que permiten la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Se detecta el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Opcionalmente, el polipéptido o anticuerpo puede marcarse con un reactivo indicador antes de la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo. El método puede comprender opcionalmente un control positivo o negativo.

60 Uno o más anticuerpos descritos en la presente descripción pueden unirse a una fase sólida o sustrato. Se adiciona al sustrato una muestra de prueba que potencialmente comprende una proteína que comprende un polipéptido descrito en la presente descripción. Se adicionan uno o más anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos descritos en la presente descripción. Los anticuerpos pueden ser los mismos anticuerpos usados en la fase sólida o pueden ser de una fuente o especie diferente y pueden unirse a un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Las etapas de lavado pueden realizarse antes de cada adición. Se adiciona un cromóforo o sustrato enzimático y se permite el desarrollo de color. La reacción de color se detiene y el color puede cuantificarse mediante el uso, por ejemplo, de un espectrofotómetro.

65

Uno o más anticuerpos descritos en la presente descripción pueden unirse a una fase sólida o sustrato. Se adiciona al sustrato una muestra de prueba que potencialmente comprende una proteína que comprende un polipéptido descrito en la presente descripción. Se adicionan segundos anticuerpos antiespecies que se unen específicamente a los polipéptidos descritos en la presente descripción. Estos segundos anticuerpos son de una especie diferente a los anticuerpos de fase sólida. Se adicionan terceros anticuerpos antiespecies que se unen específicamente a los segundos anticuerpos y que no se unen específicamente a los anticuerpos de fase sólida. Los terceros anticuerpos pueden comprender un reactivo indicador tal como un conjugado enzimático. Las etapas de lavado pueden realizarse antes de cada adición. Se adiciona un cromóforo o sustrato enzimático y se permite el desarrollo de color. La reacción de color se detiene y el color puede cuantificarse mediante el uso, por ejemplo, de un espectrofotómetro.

Los ensayos descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, los basados en ensayos de competencia, reacción directa o tipo sándwich, que incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia occidental, IFA, radioinmunoensayo (RIA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), y ensayos de placa de microtitulación (cualquier ensayo realizado en uno o más pocillos de una placa de microtitulación). Un ensayo descrito en la presente descripción comprende un ensayo de unión cromatográfica de flujo reversible, por ejemplo un ensayo SNAP®. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5,726,010.

Los ensayos pueden usar fases o sustratos sólidos o pueden realizarse mediante inmunoprecipitación o cualquier otro método que no utilice fases sólidas. Cuando se usa una fase sólida o sustrato, uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción se unen directa o indirectamente a un soporte sólido o a un sustrato tal como un pocillo de microtitulación, perlas magnéticas, perlas no magnéticas, columna, matriz, membrana, estera fibrosa compuesta de fibras sintéticas o naturales (por ejemplo, materiales de vidrio o a base de celulosa o polímeros termoplásticos, tales como, por ejemplo, polietileno, polipropileno, o poliéster), estructura sinterizada compuesta de materiales en forma de partículas (por ejemplo, vidrio o varios polímeros termoplásticos), o película de membrana moldeada compuesta de nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares (generalmente de naturaleza sintética). Un sustrato puede ser sinterizado, partículas finas de polietileno, comúnmente conocidas como polietileno poroso, por ejemplo, polietileno poroso de 10-15 micras de Chromex Corporation (Albuquerque, NM). Todos estos materiales de sustrato pueden usarse en formas adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden recubrirse o unirse o laminarse a portadores inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico, o telas. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analitos, por ejemplo, polipéptidos de *E. canis*, en un dispositivo o soporte sólido se realiza de manera que los procedimientos de muestra, diluyente y/o lavado no eliminan un reactivo de captura de analitos. Uno o más reactivos de captura de analitos pueden unirse a una superficie mediante adsorción física (es decir, sin el uso de enlazadores químicos) o mediante unión química (es decir, con el uso de enlazadores químicos). La unión química puede generar una unión más fuerte de los reactivos de captura en una superficie y proporcionar una orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

En un tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos pueden recubrirse en una fase sólida o sustrato. Una muestra de prueba que se sospecha que contiene anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o sus fragmentos de unión a antígenos se incuba con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal conjugado a un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos antígeno/anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos de la muestra de prueba a los polipéptidos de la fase sólida o el compuesto de reactivo indicador conjugado a un anticuerpo específico para *Ehrlichia canis* a los polipéptidos de la fase sólida. La reducción en la unión del reactivo indicador conjugado a los anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* a la fase sólida puede medirse cuantitativamente. Una reducción medible de la señal en comparación con la señal generada a partir, por ejemplo, de una muestra de prueba de *Ehrlichia canis* negativa confirmada indica la presencia de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en la muestra de prueba. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

En otro tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción se recubren sobre un soporte o sustrato. Un polipéptido descrito en la presente descripción se conjuga a un reactivo indicador y se adiciona a una muestra de prueba. Esta mezcla se aplica al soporte o sustrato. Si los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra de prueba, se unirán al uno o más polipéptidos conjugados a un reactivo indicador y al uno o más polipéptidos inmovilizados en el soporte. Después puede detectarse el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

En otro tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción se recubren sobre un soporte o sustrato. La muestra de prueba se aplica al soporte o sustrato y se incuba. Los componentes que no se unieron de la muestra se lavan mediante el lavado del soporte sólido con una solución de lavado. Si los anticuerpos específicos para *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra de prueba, se unirán al polipéptido recubierto en la fase sólida. Este complejo polipéptido/anticuerpo puede detectarse mediante el uso de un segundo anticuerpo específico de la especie que se conjuga a un reactivo indicador. Después puede detectarse el complejo polipéptidos/anticuerpos/indicador de anticuerpos antiespecies. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba.

En la presente descripción se describe un dispositivo que es adecuado para un ensayo de flujo lateral. Por ejemplo, una muestra de prueba se adiciona a una matriz de flujo en una primera región (una zona de aplicación de muestra). La muestra de prueba se transporta en una trayectoria de flujo de fluido por acción capilar a una segunda región de la matriz de flujo donde una etiqueta capaz de unirse y formar un primer complejo con un analito en la muestra de prueba. El primer complejo se transporta a una tercera región de la matriz de flujo donde un polipéptido de *E. canis* se inmoviliza en una ubicación distinta. Se forma un segundo complejo entre un polipéptido inmovilizado y el primer complejo que incluye el anticuerpo de la muestra. Por ejemplo, un primer complejo que comprende una partícula de sol de oro y un polipéptido de *E. canis* unido a un anticuerpo para *E. canis* se unirá específicamente y formará un segundo complejo con un segundo polipéptido de *E. canis* inmovilizado o con un segundo anticuerpo dirigido a anticuerpos para *E. canis*. La etiqueta que es parte del segundo complejo puede visualizarse directamente.

En otro aspecto, se describen en la presente descripción uno o más reactivos de unión específicos etiquetados que pueden mezclarse con una muestra de prueba antes de su aplicación a un dispositivo descrito en la presente descripción. En este caso, no es necesario que se etiqueten los reactivos de unión específicos depositados y secarlos en una almohadilla de reactivo de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específico etiquetado, ya sea adicionado a una muestra de prueba o predepositado en el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado que se une específicamente a un anticuerpo para *E. canis*.

Un antígeno DIVA de *E. canis* o un antígeno vacunal de *E. canis*, por ejemplo, un polipéptido, puede ser un reactivo de captura de analito inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de analito, por ejemplo un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM, que se conjugó a una etiqueta, puede adicionarse a la muestra antes de adicionar la muestra al dispositivo, o el segundo reactivo de captura de analito puede incorporarse al dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de unión específico etiquetado puede depositarse y secarse en una trayectoria de flujo de fluido que proporciona una comunicación de fluidos entre la zona de aplicación de la muestra y la fase sólida. El contacto del reactivo de unión específico etiquetado con la muestra de fluido da como resultado la disolución del reactivo de unión específico etiquetado.

El dispositivo puede incluir, además, un reactivo líquido que transporta material no unido (por ejemplo, muestra de fluido no reaccionado y reactivos de unión específicos no unidos) fuera de la zona de reacción (fase sólida). Un reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y servir solo para eliminar material no unido de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir para eliminar material no unido y facilitar la detección de analitos. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de unión específico conjugado a una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el conjugado enzima-anticuerpo en la zona reactiva. En el caso de un reactivo de unión específico etiquetado conjugado a una molécula radiactiva, fluorescente o de absorción de luz, el reactivo detector actúa simplemente como una solución de lavado que facilita la detección de la formación del complejo en la zona reactiva mediante el lavado del reactivo etiquetado no unido.

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

Un reactivo líquido puede incluir además una cantidad limitada de un "inhibidor", es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Una cantidad limitada es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo del producto final hasta que la mayoría o todo el exceso de material no unido se transporte lejos de la segunda región, en cuyo momento se produce el producto final detectable.

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

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

Los métodos descritos en la presente descripción pueden indicar además la cantidad o cantidad de anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* en una muestra de prueba. Con muchos reactivos indicadores, tales como conjugados enzimáticos, la cantidad de anticuerpo presente es proporcional a la señal generada. En dependencia del tipo de muestra de prueba,

puede diluirse con un reactivo tampón adecuado, concentrarse, o ponerse en contacto con una fase sólida sin ninguna manipulación. Por ejemplo, por lo general se prefiere probar muestras de suero o plasma que se diluyeron previamente, o especímenes concentrados tales como orina, para determinar la presencia y/o cantidad de anticuerpo presente.

5 En la presente descripción se describen, además, kits de ensayo (por ejemplo, artículos de fabricación) para detectar anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, o polipéptidos de *Ehrlichia canis* en una muestra. Un kit comprende uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción y medios para determinar la unión del polipéptido a los anticuerpos anti-*Ehrlichia canis* o fragmentos de anticuerpos en la muestra. Un kit o artículo de fabricación puede comprender, además, uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente descripción y medios para determinar la unión de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a los polipéptidos de *Ehrlichia canis* en la muestra. Un kit puede comprender un dispositivo que contiene uno o más polipéptidos o anticuerpos descritos en la presente descripción e instrucciones de uso de uno o más polipéptidos o anticuerpos para, por ejemplo, la identificación de una infección por *Ehrlichia canis* en un mamífero. El kit puede comprender, además, material de empaque que comprende una etiqueta que indica que el uno o más polipéptidos o anticuerpos del kit pueden usarse para la identificación de la infección por *Ehrlichia canis*. Otros componentes tales como tampones, estabilizadores, controles positivos, controles negativos, reactivos de detectores y similares, conocidos por los expertos en la técnica, pueden incluirse en tales kits de prueba. Los polipéptidos, anticuerpos, ensayos, y kits descritos en la presente descripción son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de casos individuales de infección por *Ehrlichia canis* en un paciente, así como también en estudios epidemiológicos de brotes de *Ehrlichia canis*. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse, para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones adecuadas para combinarse con una muestra.

25 Los polipéptidos y ensayos descritos en la presente descripción pueden combinarse con otros polipéptidos o ensayos para detectar la presencia de *Ehrlichia canis* junto con otros organismos. Por ejemplo, los polipéptidos y ensayos descritos en la presente descripción pueden combinarse con reactivos que detectan el gusano del corazón y/o *Borrelia burgdorferi* y/o *Ehrlichia chaffeensis* y/o *Anaplasma platys* y/o *Anaplasma phagocytophilum*.

30 Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra. Los polinucleótidos pueden usarse para detectar polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra mediante una reacción de hibridación simple y, además, pueden usarse en, por ejemplo, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) tales como una reacción de PCR en tiempo real. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción también pueden usarse para detectar de manera diferenciada la presencia de *Ehrlichia canis* de otras *Ehrlichia sp.*, tal como *Ehrlichia chaffeensis*.

35 Los ensayos de PCR se describen bien en la técnica, que incluye, por ejemplo, la patente de Estados Unidos NO 4,683,195; patente de Estados Unidos NO 4,683,202; patente de Estados Unidos NO 4,965,188. Generalmente, los cebadores de polinucleótidos se hibridan a hebras desnaturalizadas de un ácido nucleico diana. Los productos de extensión de cebador se forman por polimerización de trifosfatos desoxinucleósidos mediante una polimerasa. A continuación, la PCR implica ciclos repetitivos de desnaturalización del ácido nucleico molde, hibridación de cebadores y extensión de los cebadores hibridados mediante la acción de una polimerasa termoestable. El proceso da como resultado la amplificación exponencial de los ácidos nucleicos de *Ehrlichia canis* diana en la muestra de prueba, lo que permite la detección de polinucleótidos diana que existen en concentraciones muy bajas en una muestra.

40 Los ensayos de PCR en tiempo real se basan en la detección de una señal, por ejemplo, una señal de informador fluorescente. Esta señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en una reacción. La PCR en tiempo real es cualquier técnica de amplificación que permite supervisar la evolución de una reacción de amplificación continua. Ver, Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Detection, Perkin Elmer Applied Biosystems (1999); PCR Protocols (Academic Press New York, 1989). Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorear la reacción de PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial del molde diana. Cuanto mayor sea el número de copias iniciales de la diana de ácido nucleico, más pronto se observará un aumento significativo de la fluorescencia.

50 En la presente descripción se describe un método para detectar y/o cuantificar polinucleótidos de *Ehrlichia canis* en una muestra de prueba. Los cebadores directos y los cebadores inversos pueden adicionarse a una muestra de prueba en condiciones adecuadas para una reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores se hibridan con los polinucleótidos de *Ehrlichia canis* de manera que se forma un producto de amplificación si los polinucleótidos de *Ehrlichia canis* están presentes en la muestra de prueba. Se detectan productos de amplificación y se determina la presencia y/o cantidad de polinucleótidos de *Ehrlichia canis*. Los productos de amplificación pueden detectarse con una sonda de polinucleótidos que hibrida, en condiciones adecuadas para una reacción en cadena de la polimerasa, con una secuencia de polinucleótidos de *Ehrlichia canis*. El producto de amplificación puede cuantificarse mediante la medición de una señal de detección de la sonda y la comparación de dicha señal de detección con una segunda señal

de detección de la sonda de un estándar de cuantificación. El estándar de cuantificación puede extraerse en paralelo con la muestra de prueba.

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

5 Un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo DIVA descrito en la presente descripción podría usarse para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Sin embargo, si se usa un polipéptido DIVA para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*, no podría, después de eso, usarse como un polipéptido DIVA para la detección y diferenciación de animales infectados, no vacunados y vacunados porque el sistema inmunitario de un animal vacunado podría reconocer el antígeno DIVA usado para la vacunación. Sin embargo, un polipéptido DIVA que no reacciona de forma cruzada con anticuerpos al polipéptido DIVA usado para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad causada por *E. canis* todavía puede usarse como un antígeno DIVA de *E. canis*.

15 Por ejemplo, si la SEQ ID NO:2 o un fragmento de esta se usa como vacuna, entonces la SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o sus combinaciones pueden usarse como un polipéptido DIVA, si no reaccionan de forma cruzada con anticuerpos específicos para la SEQ ID NO:2. Actualmente, ninguna de las SEQ ID NO:10, 22-33 se usa en una vacuna de subunidades comercial contra *E. canis* y las SEQ ID NO:10, 22-33 no detectan anticuerpos específicos para *E. canis* en animales vacunados con células de *E. canis* inactivadas enteras. Por lo tanto, la selección de polipéptidos DIVA no es actualmente un problema. Sin embargo, los expertos en la técnica conocen la composición de las vacunas de *E. canis*. Si una vacuna comercial de subunidades de *E. canis* comprendiera las SEQ ID NO:10, 22-33, entonces un experto en la técnica evitaría el uso de las SEQ ID NO:10, 22-33 (si es necesario debido a la generación de anticuerpos de *E. canis* específicos para las SEQ ID NO:10, 22-33) para diferenciar el estado de vacunación y en su lugar usaría otros antígenos DIVA de *E. canis*.

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

30 Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal descrito en la presente descripción o sus fragmentos, puede administrarse a un animal, tal como un ser humano. Un anticuerpo o sus fragmentos pueden administrarse a un animal en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o sus fragmentos. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para aliviar los síntomas de la infección por *E. canis* o para reducir la cantidad de organismos de *E. canis* en un sujeto.

40 Los polipéptidos o polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden estar presentes en una composición inmunogénica y usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un huésped. Una composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. Una composición inmunogénica de polipéptidos o polinucleótidos descrita en la presente descripción es particularmente útil para sensibilizar un sistema inmunitario de un animal de manera que, como resultado, se produce una respuesta inmunitaria que mejora o evita el efecto de la infección por *E. canis*. La inducción de una respuesta inmunitaria en un modelo animal puede ser útil para determinar, por ejemplo, dosis óptimas o rutas de administración. La inducción de una respuesta inmunitaria también puede usarse para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o infección causada por *E. canis*. Una respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias humorales o respuestas inmunitarias mediadas por células, o sus combinaciones. Una respuesta inmunitaria puede comprender además la promoción de una respuesta generalizada del huésped, por ejemplo, mediante la promoción de la producción de defensas.

50 La generación de un título de anticuerpo por un animal contra *E. canis* puede ser importante en la protección contra la infección y la eliminación de la infección. La detección y/o cuantificación de los títulos de anticuerpos después del suministro de un polipéptido o polinucleótido puede usarse para identificar epítopos que son particularmente efectivos para obtener títulos de anticuerpos. Los epítopos responsables de una respuesta fuerte de los anticuerpos contra *E. canis* pueden identificarse al provocar anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de *E. canis* de diferentes longitudes. Los anticuerpos provocados por un epítipo de polipéptido particular pueden probarse mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo ELISA para determinar qué polipéptidos contienen epítopos que son más efectivos para generar una respuesta fuerte. Los polipéptidos o proteínas de fusión que contienen estos epítopos o polinucleótidos que codifican los epítopos pueden construirse y usarse para provocar una respuesta fuerte de anticuerpos.

60 Un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse a un mamífero, tal como un ratón, conejo, cobaya, macaco, babuino, chimpancé, humano, vaca, oveja, cerdo, caballo, perro, gato o a animales tales como pollos o patos, para obtener anticuerpos *in vivo*. La inyección de un polinucleótido tiene las ventajas prácticas de la simplicidad de construcción y modificación. Además, la inyección de un polinucleótido da como resultado la síntesis de un polipéptido en el huésped. Por lo tanto, el polipéptido se presenta al sistema inmunitario del huésped con modificaciones, estructura y conformación postraduccionales nativas. Un polinucleótido puede suministrarse a un sujeto como "ADN desnudo".

- La administración de un polinucleótido, polipéptido, o anticuerpo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye inyección intramuscular, intravenosa, intrapulmonar, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, aerosol, intranasal, bomba de infusión, supositorio, mucosa, tópica y oral, que incluye la inyección mediante el uso de una pistola balística biológica ("pistola genética"). Un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo puede acompañarse de un portador de proteína para la administración oral. Una combinación de métodos de administración también puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden administrarse a una dosis diaria de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg. Los anticuerpos pueden administrarse a una dosis diaria de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg.
- Los portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. (1985)). El portador no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el hospedero. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como SEPHA-ROSE® funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, microesferas de celulosa y similares, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos tales como ácido poliglútamico, polilisina, y similares, copolímeros de aminoácidos, peptoides, liptoides, y células bacterianas o partículas de virus avirulentas. Los liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y bioadhesivos también pueden usarse como portadores de una composición descrita en la presente descripción.
- Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden usarse en las composiciones descritas en la presente descripción, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, hidrobromuro, fosfatos, o sulfatos, así como también sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Los sustratos proteicos especialmente útiles son las albúminas séricas, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones descritas en la presente descripción también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de Hank, glucosa, glicerol, dextrosa, malodextrina, etanol, o similares, individualmente o en combinación, así como también sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes para ajustar la tonicidad, detergentes, o agentes tamponantes de pH. También pueden usarse agentes activos adicionales, tales como agentes bactericidas.
- Si se desea, las moléculas coestimuladoras, que mejoran la presentación del inmunógeno a los linfocitos, tales como B7-1 o B7-2, o citocinas tales como MIP1 α , GM-CSF, IL-2 e IL-12, pueden incluirse en una composición descrita en la presente descripción. Opcionalmente, los adyuvantes también pueden incluirse en una composición. Los adyuvantes son sustancias que pueden usarse para aumentar de forma no específica una respuesta inmunitaria específica. Generalmente, un adyuvante y un polipéptido descritos en la presente descripción se mezclan antes de su presentación al sistema inmunitario, o se presentan por separado, pero se presentan en el mismo sitio del animal. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, coadyuvantes de aceite (por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund) sales minerales (por ejemplo, Alk(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄), sílice, Alúmina, Al(OH)₃, y Ca₃(PO₄)₂), polinucleótidos (es decir, ácidos poliicos y poli AU), y ciertas sustancias naturales (es decir, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como también sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*). Los adyuvantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a MF59-0, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637), denominado no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A de monofosforilo, trehalosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/TWEEN® 80.
- Las composiciones descritas en la presente descripción pueden formularse en comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trocas, cápsulas, elixires, suspensiones, siropes, obleas, formulaciones inyectables, enjuagues bucales, dentríficos, y similares. El porcentaje de uno o más polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos descritos en la presente descripción en tales composiciones y preparaciones puede estar en el intervalo del 0,1 % al 60 % del peso de la unidad.
- La administración de polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos puede provocar una respuesta inmunitaria en el animal que dura al menos 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, o más. Opcionalmente, una respuesta inmunitaria puede mantenerse en un animal al proporcionar una o más inyecciones de refuerzo del polipéptido, polinucleótido, o anticuerpos en 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año o más después de la inyección primaria. Si se desea, las moléculas coestimuladoras o los adyuvantes también pueden proporcionarse antes, después, o junto con las composiciones.
- Una composición descrita en la presente descripción que comprende un polipéptido, polinucleótido, anticuerpo, o una de sus combinaciones se administra de una manera compatible con la composición particular usada y en una cantidad que es efectiva para inducir una respuesta inmunitaria como se detecta por, por ejemplo, un ELISA. Un polinucleótido puede inyectarse intramuscularmente a un mamífero, tal como un babuino, chimpancé, perro o ser humano, a una dosis de 1 ng/kg, 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1000 ng/kg, 0,001 mg/kg, 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg. Un polipéptido o anticuerpo

puede inyectarse intramuscularmente a un mamífero a una dosis de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 o 10 mg/kg.

Los polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos, o una de sus combinaciones pueden administrarse a un animal que no está infectado con *E. canis* o puede administrarse a un animal infectado con *E. canis*. Las dosis particulares de polinucleótido, polipéptidos o anticuerpos en una composición dependerán de muchos factores que incluyen, pero no se limitan a la especie, edad, sexo, medicación concurrente, condición general del mamífero al que se administra la composición, y el modo de administración de la composición. Una cantidad efectiva de la composición descrita en la presente descripción puede determinarse fácilmente mediante el uso solamente de experimentación rutinaria.

Se proporciona, además, un método para monitorear una infección por *E. canis* en un paciente. El método incluye determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una muestra de un fluido biológico de un paciente que padece o está en riesgo de padecer una infección por *E. canis* en un primer punto de tiempo mediante el uso de polipéptidos descritos en la presente descripción. El nivel de anticuerpos anti-*E. canis* se determina en una o más muestras del fluido biológico del paciente en uno o más puntos de tiempo diferentes. Los niveles de anticuerpos anti-*E. canis* se determinan en diferentes puntos de tiempo de manera que se monitorea la infección por *E. canis*. El nivel o la cantidad de anticuerpos anti-*E. canis* proporcionan una indicación del éxito del tratamiento o la terapia, o de la progresión de la infección.

En cada caso en la presente descripción, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente de" y "que consiste de" puede reemplazarse con cualquiera de los otros dos términos, mientras que retiene sus significados ordinarios. Los términos y expresiones que se emplearon se usan como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que en el uso de tales términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o sus porciones.

En adición, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush u otro grupo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de *E. canis* inactivada con formalina para su inmunización en perros

E. canis se cultiva en cultivo celular canino mediante el uso de los métodos descritos en la literatura. Ver, por ejemplo, Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and chemotherapy, 1998, Vol. 42:362-368. Mediante el uso de microscopía óptica, se estimó que las células O30 se infectaron por *E. canis* por más del 80 %. Se recolectaron dos litros de cultivo celular infectado con *E. canis*, se centrifugaron y el sedimento se retuvo y produjo 7,31 g de material (peso húmedo). Se supone que el agua representa el 80 % del peso del material, lo que da un peso en seco estimado de 1,462 g (20 % del peso del material). El sedimento celular se resuspendió a 20 mg/ml en PBS (peso en seco) para un volumen total de 73 ml.

A este sedimento celular resuspendido, se adicionaron 0,73 ml de solución de formalina (Catálogo Sigma Solución de formalina HT50-1-2 al 10 %, tamponada a neutral) para una concentración final de formaldehído de 0,04 %. La solución se agitó durante toda la noche a 4 °C. La mezcla inactivada se centrifugó y el sedimento celular se retuvo. El sedimento se lavó mediante resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recolectó mediante centrifugación y el lavado se repitió una vez.

El sedimento celular lavado se resuspendió en 73 ml de PBS. La muestra se distribuyó en alícuotas en 73 viales con tapón de rosca y se congeló a -80 °C. Cada vial contiene 20 mg (peso en seco) de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina, adecuados para combinarse con el adyuvante adecuado para la inmunización en animales.

Ejemplo 2

Preparación de *E. canis* inactivada con formalina con dos adyuvantes diferentes, protocolo para la inmunización de beagles con antígeno de *E. canis* y análisis de sueros a partir de beagles inmunizados mediante el uso de SNAP® 3Dx®.

La preparación del antígeno con el adyuvante de hidróxido de aluminio es una técnica bien conocida para los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, 1988, pág. 99.

Para la inmunización en perros (beagles de laboratorio), se prepararon dos conjuntos de dosis con un adyuvante de hidróxido de aluminio preparado como se describió anteriormente y dos conjuntos de dosis se prepararon con un adyuvante Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) mediante el uso del protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina (peso en seco).

Los beagles de laboratorio mantenidos en la jaula se seleccionaron para la inmunización con el antígeno de *E. canis* inactivada con formalina. Dos grupos de dos perros cada uno; donde cada grupo usa un adyuvante diferente se dosificó con la preparación de *E. canis* inactivada con formalina (óxido de aluminio o Ribí). En el día 0 se observó que los 4 perros eran seronegativos con el uso tanto del diagnóstico SNAP® 3Dx® así como también del análisis de inmunotransferencia western mediante el uso del organismo *E. canis*.

El comité del IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de beagles de laboratorio. Los perros se vacunaron los días 0, 28 y 56 con sangrados semanales de 1 ml monitorizados mediante el uso de SNAP® 3Dx®. A todos los perros se les administró el artículo de prueba adecuado por vía subcutánea en el área dorsoescapular. Los cuatro animales seroconvirtieron a una prueba positiva en *E. canis* SNAP®3Dx® para el día 42. Los sangrados de producción se obtuvieron en los días 42 y 70 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjo aproximadamente 25 ml de suero).

La Figura 1 muestra la evaluación del ensayo SNAP®3Dx® de los beagles de laboratorio. El dispositivo SNAP® se usó como se describió por el fabricante. La muestra "Pre" es del día 0. La muestra "Pos" es del día 42. El punto positivo a *E. canis* se vuelve positivo en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

Experimentos con una tercera vacuna que comprende un tercer adyuvante, BCG, (Calbiochem of EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA) reveló resultados similares. La preparación de la tercera vacuna fue idéntica a las preparaciones descritas para la vacuna complementaria Ribí descrita anteriormente, excepto: 1) la inactivación de formalina fue durante 24 horas a 4 °C, y 2) se adicionó 1 mg de BCG. El calendario de vacunación fue el día 0, día 14, con sangrados semanales analizados para determinar la reactividad con las proteínas de *E. canis*.

Ejemplo 3

Enriquecimiento de *E. canis* a partir de cultivo celular mediante el uso de gradientes de PERCOLL®.

Para el aislamiento de ADN y el análisis de inmunotransferencia western, *E. canis* se enriqueció a partir de un cultivo celular mediante el uso de gradientes de densidad de PERCOLL®. El proceso de aislamiento de patógenos intracelulares a partir del cultivo celular, tal como *Ehrlichia*, es una técnica bien conocida para los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Akira y otros (1982) Purification of Rickettsia tsutsugamushi by PERCOLL® density gradient centrifugation, Microbiol. Immunol., 26:321-328.

Un enriquecimiento típico de *E. canis* comenzó con 1,5 litros de cultivo celular infectado (ver más arriba). Las células se centrifugaron 6000 x g, el sedimento celular se retuvo y el sobrenadante se desechó. El sedimento celular se resuspendió en 20 ml de PBS, seguido de una segunda centrifugación. El sobrenadante se desechó y el sobrenadante se conservó. El sedimento se resuspendió en 20 ml de PBS, se sometió a ultrasonido durante 5 segundos a 20 kHz, ajuste de potencia 1,5 mediante el uso de un ultrasonido Branson. Después la muestra se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos para sedimentar residuos grandes.

Se adicionó PERCOLL® al sobrenadante a una concentración final de 32 % (4,5 ml de PERCOLL® con 10 ml de muestra). La muestra se cargó en tubos Oak Ridge compatibles con un rotor de ultracentrifuga de 70,1 Ti y se centrifugó durante 30 minutos a 63 000 x g. La banda opaca se recolectó mediante el uso de una pipeta Pasteur. La banda opaca está altamente enriquecida para *Ehrlichia* (confirmada mediante el uso de microscopía óptica de la muestra recolectada). Después de una dilución 1:4 con PBS, la muestra se alícuotó y se centrifugó a 12 000 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento de *Ehrlichia* se conservó a -80 °C.

Ejemplo 4

Pruebas de sueros o plasma de perros vacunados e infectados por inmunotransferencia western.

El uso del análisis de gel de SDS-PAGE en 1 dimensión y el análisis de gel en 2 dimensiones (enfoque isoelectrico en la 1a dimensión, SDS-PAGE en la 2a dimensión) es bien conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubel y otros, John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.2.2-10.3.11. El uso de inmunotransferencias Western para analizar proteínas separadas mediante el uso de estos métodos se conoce bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubel y otros, John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.8.1-10.8.116.

El trabajo inicial se realizó mediante el uso del análisis por inmunotransferencia western de proteínas separadas con geles 1D (datos no mostrados), seguido del análisis por inmunotransferencia western de proteínas separadas mediante el uso de geles 2D. Las proteínas de *E. canis* entera cosechadas a partir de cultivo celular se analizaron mediante el uso de electroforesis en gel 2D (materiales y reactivos usados como se describió por el fabricante; Bio-Rad Life Sciences Research, Hercules, CA 94547). La cantidad de muestra a cargar por gel se determinó empíricamente (ver Figura 2). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se probaron mediante el uso de sueros

caninos de beagles de laboratorio en el día 0, perros vacunados con el antígeno de *E. canis* inactivada con formalina (ver arriba), o sueros de animales infectados con *E. canis* (ver Figuras 3, 4 y 5).

5 Se aislaron sueros y plasma caninos positivos de perros infectados con *E. canis*. La infección por *E. canis* se verificó mediante el análisis por inmunotransferencia western de linfocitos extraídos de sangre completa de estos perros, y se confirmó mediante el uso del ensayo IDEXX SNAP®3Dx® con suero o plasma canino (comercialmente disponible en IDEXX Laboratories Inc., usado como se describió por el fabricante).

10 Para el análisis de inmunotransferencia Western, las proteínas se separaron mediante el uso de geles de enfoque isoelectrico/SDS-PAGE 1D o SDS-PAGE 2D seguidos de electrotransferencia de las proteínas de los geles a nitrocelulosa. Las transferencias en nitrocelulosa se incubaron en una solución de bloqueo de leche seca no grasa al 2,5 % disuelta en solución salina tamponada con Tris (pH 7,5), 0,05 % TWEEN® 20. Los sueros o el plasma caninos se diluyeron hasta el título como se describió en un tampón que contenía un lisado de *E. coli* para bloquear la unión no específica con suero normal de ternero al 30 % y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante 15 la noche a 4 °C. Después del lavado 3 veces en TBS-TWEEN® (0,05 %), las transferencias se transfirieron a un tampón que contenía suero fetal de ternero al 50 %, TBS-TWEEN®-Kathon al 50 % (0,05 % y 0,5 % respectivamente) para evitar la unión inespecífica de un anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research, West Grove, PA 19390). El conjugado de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo se diluyó 1:5000. Los geles se lavaron 3 veces con TBS TWEEN® (0,05 %), una vez con TBS y la presencia de HRP se detectó mediante el uso de reactivos de detección de inmunotransferencia de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855-1327) usados como se describió por el fabricante. Las imágenes digitales de la película de rayos X expuesta se capturaron mediante el uso de un GelDoc 2000 (Bio-Rad Inc.).

25 Ejemplo 5

Aislamiento del ADN de *E. canis* y construcción de una biblioteca de expresión lambda y cribado de la biblioteca de expresión lambda de *E. canis* para clones que tienen actividad DIVA.

30 La preparación y el cribado de bibliotecas de expresión lambda es una técnica bien conocida para los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F.M. Ausubel y otros, John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 5.1 a 5.8.6. Para la construcción de la biblioteca de expresión, el ADN genómico se purificó a partir de *E. canis* aislada a partir de cultivo celular mediante centrifugación por gradiente de PERCOLL® (ver más arriba). El ADN se purificó mediante el uso de un kit de purificación de ADN genómico de Qiagen Sciences (Germantown, MD). Para la construcción de la biblioteca se usó un kit de vectores EcoRI/CIAP prehidrolizado enzimáticamente Lambda ZAP® II (Stratagene Corp., La Jolla, CA 92037) como se especificó por el fabricante. El ADN genómico de *E. canis* se hidrolizó enzimáticamente parcialmente con TSP509 y los fragmentos que están en el intervalo de 2-6 kb se aislaron mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en el vector lambda. Los fagos se empaquetaron y crecieron como se especificó por el fabricante.

40 Se cribaron aproximadamente 120 000 placas lambdas individuales para la unión a sueros aislados de perros identificados como positivos para infección por *E. canis*, pero negativos para reactividad con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina (ver más arriba). A partir del cribado inicial se identificaron 84 placas individuales con esta actividad.

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

50 Las placas lambda aisladas se sometieron a cribado para determinar la reactividad cruzada con sueros de animales identificados como seropositivos para *Anaplasma phagocytophilia*, *Borrelia burgdorferi* (agente causal de la enfermedad de Lyme), *Rickettsia rickettsii* (agente causal de la fiebre moteada de las Montañas Rocosas), *Leptospira interrogans* y *Dirofilaria immitis* (agente causal del gusano del corazón canino).

55 Al final del proceso de cribado, se encontraron 43 placas lambda que reaccionaban con sueros de animales infectados con *E. canis* que no reaccionaban con sueros de perros vacunados o sueros de perros infectados con otros patógenos caninos (ver más arriba).

60 Mediante el uso de la característica ZAP® del vector de clonación según las instrucciones del fabricante, las inserciones en el vector lambda se convirtieron en plásmidos. Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* XL-1 azul para la expresión de proteínas y el análisis de proteínas codificadas por inmunotransferencia western. Los extremos de los insertos de ADN de *E. canis* se sometieron a análisis de secuencia de ADN mediante el uso de cebadores de secuenciación T7 y T3.

65 La información de la secuencia de tanto la reacción de T7 como de T3 para los 43 clones se envió para el análisis BLAST al sitio web del NCBI. Los resultados se tabularon en un formato Excel. En base a la identidad de la secuencia entre el clon y la secuencia del genoma de escopeta disponible para *E. canis* (NCBI: NZ_AAEJ01000001), se

identificaron segmentos de ADN genómico para cada clon. Los clones individuales que compartían genes comunes se agruparon para un análisis posterior por inmunotransferencia western mediante el uso de grupos de sueros caninos infectados y vacunados. Basados en patrones de bandas similares, se eliminaron clones duplicados. Se eliminó cualquier clon que mostrara reactividad a ambos conjuntos de sueros. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 23 clones para una evaluación adicional. La agrupación de los clones y el antígeno común por grupo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Antígeno común	Número de clon(es)
Antígeno de 120 kDa	2, 10, 17,33,35,79
Proteínas de choque térmico	4, 9, 24, 66
ATPasa	7, 84
Proteína ribosomal L1	21,47,65
Antígeno de 200 kDa	26, 55, 76
Proteína hipotética	75
Piruvato deshidrogenasa	5
Proteína ribosomal (50S)	6
Desconocida	57
Regulador transcripcional	82

Ejemplo 6

Análisis de transferencia Western mediante el uso de muestras de suero canino individuales positivas a *E. canis*

Los 23 clones se analizaron en geles de SDS-PAGE individuales. Cada gel se transfirió a la nitrocelulosa y se sometió a la inmunotransferencia western mediante el uso de muestras individuales de sueros caninos de perros que solo eran positivos para infecciones por *E. canis* mediante la prueba ELISA/SNAP®. El suero canino se diluyó 1:500 en el mismo diluyente descrito en el Ejemplo 4 que contiene el lisado de *E. coli* y se detectó reactividad mediante el uso de técnicas colorimétricas estándar de peroxidasa de rábano picante (Opti-4CN, Bio-Rad). Se evaluó un total de trece muestras individuales de suero canino. Se compararon las manchas en las muestras para determinar el número de perros que muestran reactividad a una banda predominante o conjunto de bandas por clon. Los resultados se resumen en la Tabla 3 y la Figura 6 (los clones enumerados en negrita se representan en la figura).

Tabla 3.

Antígeno común	Número de clon(es)	Reactores positivos
Antígeno de 120 kDa	2, 10, 17, 33, 35	13/13
Proteínas de choque térmico	9	12/13
ATPasa	7, 84	12/13
Proteína ribosomal L1	21,47,65	12/13
Antígeno de 200 kDa	26, 55, 76	12/13

Los 23 clones también se analizaron mediante inmunotransferencia western mediante el uso de sueros caninos combinados que habían dado positivo para otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. Se evaluaron las muestras que dieron positivo por ELISA o SNAP® para las siguientes infecciones únicas: Gusano del corazón, Lyme, *Anaplasma phagocytophilum*, o *E. ewingii*. Ninguno de los clones identificados en la tabla anterior mostró reactividad cruzada con sueros caninos positivos para estas otras infecciones transmitidas por vectores.

Ejemplo 7

Identificación de segmentos génicos relevantes que codifican antígenos DIVA de *E. canis*.

a. Antígeno de 120 kDa

Este antígeno fue descrito previamente por Yu y otros (J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):369-74; ver también McBride y otros, 2000 Infec. Immun. 68:13) y demostró ser útil en el diagnóstico de infecciones por *E. canis* en perros. Este

antígeno se describió tanto como antígeno "p120" y como "p140" de *E. canis*. Ver, *id.* Yu y otros explican que una proteína recombinante expresada por el gen p120 tiene un tamaño molecular de 140 kDa en un gel de dodecilsulfato de sodio, que es mayor que la masa molecular prevista de la proteína. Ver, Yu y otros, página 373. El grupo Walker (Yu y otros, y McBride y otros) se refieren a la proteína como *E. canis* p120 y p140. Por lo tanto, esta descripción usa tanto p120 como p140 indistintamente para describir esta proteína. El número de acceso para el gen de *E. canis* p120/140 es AF112369 y la proteína asociada es AAD34330. Ver también, número de acceso YP302666. Los clones 2, 10, 17 y 33 contienen segmentos de longitud completa del gen del antígeno de 120 kDa. El clon 35 puede contener un truncamiento de este gen. (Ver, SEQ ID NO: 1 y 2).

Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia génica que codifica la proteína mostrada en la SEQ NO:ID 2, de los aminoácidos 58 a 589. Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidas para expresar esta proteína se analizaron mediante inmunotransferencia western con sueros caninos infectados y en comparación con los inmunotransferencias western sondeadas con sueros de animales vacunados con células de *E. canis* inactivadas en formalina. De acuerdo con hallazgos previos, solo los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (datos no mostrados).

P120 tiene un resto de 36 aminoácidos que se repite 14 veces. Ver la SEQ ID NO:15. La porción repetida (región subrayada en la SEQ ID NO:15 es un péptido de 60 kD). La SEQ ID NO:16 muestra las 14 repeticiones alineadas. La SEQ ID NO:17 muestra la secuencia consenso de las 14 repeticiones.

En la presente descripción se describe un polipéptido que comprende:

KEEX1TPEVX2AEDLQPAVDX3SX4EHSSEVVGXsKVSX6TS (SEQ ID NO:17).
Donde

$X_1 = S \text{ o } N$
 $X_2 = K \text{ o } R$
 $X_3 = G, D, \text{ o } S$
 $X_4 = V \text{ o } I$
 $X_5 = E \text{ o } K$
 $X_6 = E \text{ o } K$

En la presente descripción se describe un polipéptido multimérico donde la SEQ ID NO:17 se repite dos o más veces. El polipéptido multimérico puede comprender, además, uno o más polipéptidos heterólogos.

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

b. Antígeno de 200 kDa

Este antígeno se describió previamente por McBride y otros (J Clin Microbiol. 2001 Jan;39(1):315-22) y se demostró que es útil en el diagnóstico de ehrlichiosis. El número de acceso para este gen es AF252298 y la proteína asociada AAK01145. Una porción de esta secuencia de proteínas se asocia con una patente publicada (SEQ ID NO:2 de la patente de Estados Unidos NO 6,355,777, número de acceso AAE96254). Identificamos una región diferente de esta proteína que sirve como antígeno diagnóstico para la ehrlichiosis y un reactivo DIVA. La porción del gen se extiende desde el nucleótido 1081 de AF252298 hasta el extremo, el nucleótido 4266. (Ver SEQ ID NO: 3 y 4).

Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia génica que codifica la proteína mostrada en la SEQ ID NO:4, de los aminoácidos 1 a 1061. Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidas para expresar esta proteína se analizaron mediante inmunotransferencia western con sueros caninos infectados y se compararon con las inmunotransferencias western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con hallazgos previos, solo los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (datos no mostrados).

c. ATPasa

Este gen (etiqueta de locus "Ecan02000699") se predijo mediante el análisis computacional automatizado de la secuencia del genoma de escopeta de *E. canis*. Este codifica una proteína de más de 4000 aminoácidos (ZP_00210575). El cribado de DIVA de *E. canis* identificó dos regiones separadas de este gen y su proteína asociada como posibles antígenos inmunodominantes y reactivos DIVA. Los segmentos de la proteína identificados en los clones 84 y 7 son los aminoácidos 1984-2774 y 2980-3740, respectivamente, del número de acceso 46308382. (Ver la SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8).

5 Ambos fragmentos de este gen se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonaron por separado en un sistema de expresión pET con una etiqueta de 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con las secuencias génicas asociadas con las proteínas mostradas en la SEQ ID NO:6 y 8, de los aminoácidos 1 a 782 y 1 a 746 respectivamente. Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidas para expresar estas proteínas se analizaron mediante inmunotransferencia western con sueros caninos infectados y se compararon con las inmunotransferencias western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. De acuerdo con hallazgos previos, solo los sueros de perros infectados reconocieron estas proteínas del peso molecular esperado (datos no mostrados).

10 d. Proteínas de choque térmico

15 Aunque este clon contenía un gen para la proteína de choque térmico, GrpE, la secuencia génica que codifica para el antígeno inmunodominante surge de una secuencia de proteína hipotética predicha por el análisis computacional automatizado del genoma. En base al peso molecular y pI de la proteína, el gen de interés en el clon 9 es el número de locus "Ecan02000495" y la proteína asociada 46308954.

20 Debido a que esta proteína solo se predice a partir de la anotación por computadora del genoma y no se identificó previamente a partir de organismos *E. canis* como una proteína inmunodominante, esta es la primera evidencia de que este gen se expresa en *E. canis* y estimula una respuesta inmunitaria en el hospedero canino infectado. La proteína se identificará como el antígeno p16 (ver la SEQ ID NO: 9 y 10).

25 Este gen se amplificó a partir del vector pBlueScript que contiene el ADN genómico de interés y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia génica asociada con el número de locus "Ecan02000495". Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidas para expresar esta proteína se analizaron mediante inmunotransferencia western con sueros caninos infectados y se compararon con las inmunotransferencias western sondeadas con sueros de animales vacunados con *E. canis* inactivada con formalina. En consonancia con los hallazgos anteriores, solo los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (ver Figura 7).

30 e. Proteína ribosomal L1

35 Este gen se identifica mediante la etiqueta de locus "Ecan02000476" del genoma de *E. canis*. La proteína asociada tiene el número de acceso ZP_00211130 (ver las SEQ ID NO:11 y 12). La identificación de esta proteína se predijo en base al análisis computacional automatizado del genoma. Un análisis de BLAST de esta proteína revela que la secuencia es aproximadamente 70 % idéntica a una proteína superficial de *E. chaffeensis* (número de acceso 4894576). La inmunoreactividad a la proteína *E. chaffeensis* se notificó previamente por Yu y otros, (J Clin Microbiol. Agosto de 1999;37(8):2568-75). La proteína de *E. chaffeensis* (número de acceso 4894576) se denomina precursor de la proteína de 106 kDa.

40 f. Posibles antígenos que no son de 120 kDa

45 Dentro del fragmento genómico que contiene el gen para el antígeno de 120 kDa, están presentes otros genes que también pueden ser inmunodominantes y reactivos DIVA. Por ejemplo, el clon 10 produce un patrón de bandas diferente en las inmunotransferencias western sondeadas con sueros infectados, en comparación con los clones que contienen el antígeno de 120 kDa solo. El clon 10 contiene información genética para los componentes VirD4 de una vía secretora de tipo IV y esta secuencia génica se identifica mediante la etiqueta del locus "Ecan02000624". Este gen codifica para una proteína de 723 aminoácidos (ZP_00211244), pero solo una porción de esta proteína parece expresarse por el clon 10, como se determina por el peso molecular de la proteína identificada en el gel (ver las SEQ ID NO:13 y14).

50 Ejemplo 8

55 Evaluación de los péptidos P140 de *E. canis*

Los sueros de beagles inmunizados con *E. canis* inactivada con formalina (muestras de vacuna) se analizaron mediante el uso de un inmunoensayo basado en placas de microtitulación preparado mediante el uso de péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis* (también conocida como p120, ver el Ejemplo 7).

60 La preparación de *E. canis* inactivada con formalina y la inmunización de beagles se describieron en los Ejemplos 1 y 2. Las muestras de beagles inmunizados se analizaron mediante el uso de inmunoensayos basados en placas de microtitulación preparados mediante el uso de péptidos sintéticos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20) en formatos de ensayo indirecto y directo.

Formato de ensayo indirecto

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

Formato de ensayo directo

Los péptidos individuales (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20) se conjugaron a albúmina sérica bovina e inmovilizaron en pocillos de microtitulación por adsorción directa. Los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20) se conjugaron con un reactivo indicador, peroxidasa de rábano picante (HRPO). La muestra de prueba y el péptido/indicador de inmunoensayo se adicionaron a un pocillo de microtitulación bien recubierto con el péptido correspondiente, que se incubó y se lavó. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado y al péptido/reactivo indicador se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato de HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4. El control positivo (PC, ID 1049:16E) y el control negativo (NC, 3818:57B) fueron muestras de suero positivas y negativas conocidas de *E. canis*, respectivamente. Todas las muestras se analizaron mediante el uso de la prueba SNAP® 4Dx® disponible comercialmente para el anticuerpo de *E. canis*. Los resultados para las muestras temporales secuenciales de 6 perros (CVYDEH, CWMBDC, CVXCSCM, CWMAXK, CVSCVA y CVXCAP) que reciben el antígeno de *E. canis* inactivado con formalina formulado con diferentes adyuvantes se muestran del día 0 al día 42 después de la inmunización. Los resultados de la prueba SNAP® 4Dx® demuestran que se indujo una respuesta de anticuerpo en los animales vacunados. Ninguna de las muestras de suero de animales vacunados fue reactiva en el formato de ensayo directo. Varias muestras (por ejemplo, del perro CWMAXK) tuvieron altas reacciones de fondo en el formato de ensayo indirecto.

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

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

Muestra	4Dx® <i>E. canis</i> Resultados	Resultados indirectos de la placa (A650)			Resultados directos de la placa (A650)		
		SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
1049:16E (PC)	0,72	2,071	2,075	1,867	2,049	1,821	1,495
3818:57B (NC)	N	0,051	0,058	0,050	0,034	0,033	0,035
CVYDEH día 0	N	0,050	0,062	0,045	0,034	0,034	0,035
día 7	N	0,048	0,052	0,042	0,033	0,032	0,036
día 14	N	0,051	0,055	0,048	0,036	0,034	0,038
día 21	N	0,044	0,062	0,051	0,035	0,034	0,040
día 28	0,04 (vw+)	0,054	0,073	0,055	0,036	0,033	0,034
día 35	0,07 (vw+)	0,049	0,058	0,047	0,033	0,035	0,039
día 42	N	0,051	0,059	0,053	0,034	0,035	0,040
CWMBDC día 0	0,08	0,054	0,085	0,082	0,035	0,033	0,038
día 7	0,20	0,064	0,078	0,072	0,038	0,035	0,035
día 14	0,30	0,058	0,081	0,085	0,038	0,033	0,040
día 21	0,24	0,051	0,101	0,078	0,037	0,040	0,039

ES 2 913 324 T3

	día 28	0,22	0,049	0,082	0,073	0,034	0,036	0,033
	día 35	0,17	0,043	0,068	0,081	0,033	0,040	0,035
	día 42	0,11	0,044	0,071	0,074	0,031	0,034	0,031
5	CVXCSCM	N	0,049	0,082	0,051	0,033	0,035	0,034
	día 0							
	día 7	N	0,038	0,076	0,052	0,034	0,033	0,037
	día 14	N	0,044	0,069	0,049	0,033	0,032	0,038
10	día 21	0,10	0,038	0,054	0,045	0,035	0,035	0,036
	(w+)							
	día 28	0,10	0,044	0,060	0,049	0,036	0,033	0,035
	(w+)							
15	día 35	0,08	0,040	0,062	0,053	0,034	0,035	0,041
	(vw+)							
	día 42	0,05	0,041	0,057	0,049	0,033	0,035	0,036
	(vw+)							
20	CWMAXK	0,07	0,043	0,078	0,054	0,034	0,039	0,037
	día 0	(vw+)						
	día 7	0,41	0,082	0,475	0,413	0,034	0,034	0,045
	día 14	0,44	0,049	0,782	0,607	0,034	0,035	0,044
25	día 21	0,36	0,092	0,587	0,440	0,033	0,037	0,038
	día 28	0,39	0,063	0,407	0,258	0,037	0,034	0,038
	día 35	0,41	0,056	0,286	0,212	0,036	0,034	0,037
	día 42	0,35	0,048	0,196	0,155	0,034	0,034	0,041
30	CVSCVA	0,10	0,039	0,084	0,084	0,033	0,033	0,038
	día 0	(w+)						
	día 7	0,37	0,040	0,107	0,066	0,032	0,032	0,036
	día 14	0,14	0,053	0,151	0,062	0,035	0,033	0,039
35	día 21	0,33	0,057	0,131	0,072	0,035	0,033	0,034
	día 28	0,29	0,049	0,104	0,058	0,035	0,034	0,036
	día 35	0,36	0,043	0,108	0,079	0,034	0,039	0,040
	día 42	0,32	0,047	0,117	0,044	0,033	0,036	0,037
40	CVXCAP	N	0,041	0,065	0,040	0,032	0,035	0,032
	día 0							
	día 7	0,34	0,058	0,106	0,068	0,036	0,033	0,033
45	día 14	0,30	0,087	0,150	0,112	0,034	0,035	0,039
	día 21	0,35	0,065	0,120	0,086	0,039	0,036	0,041
	día 28	0,19	0,054	0,103	0,059	0,035	0,036	0,032
	día 35	0,18	0,046	0,092	0,047	0,033	0,033	0,039
50	día 42	0,19	0,051	0,067	0,047	0,035	0,035	0,038

Ejemplo 9

55 Los sueros de los perros positivos y negativos a *E. canis* conocidos se analizaron mediante el uso de un inmunoensayo basado en placas de microtitulación preparado mediante el uso de los péptidos sintéticos obtenidos de la proteína p140 de *E. canis* (también conocida como p120, ver Ejemplo 7).

60 Se obtuvieron muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* y se analizaron mediante el uso de la prueba SNAP® 4Dx® para anticuerpos contra *E. canis*. Las muestras se analizaron después mediante el uso de ensayos de formato de placa de microtitulación indirecto y directo producidos mediante el uso de péptidos sintéticos derivados de la proteína P140 de *E. canis* (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).
Formato de ensayo indirecto

65 Las muestras se analizaron mediante el uso de inmunoensayos basados en placas de microtitulación preparados mediante el uso de los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20). Los péptidos individuales se inmovilizaron en pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se adicionó una dilución de la muestra de prueba

(1:100) al pocillo de microtitulación y se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO) (dilución 1:2000) antiespecie, en este caso canino, lavado y adición de un sustrato de HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

5

Formato de ensayo directo

Los péptidos individuales (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20) se conjugaron a albúmina sérica bovina e inmovilizaron en pocillos de microtitulación por adsorción directa. Los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20) se conjugaron con el reactivo indicador, peroxidasa de rábano picante (HRPO). La muestra de prueba y el péptido/indicador de inmunoensayo se adicionaron a un pocillo de microtitulación bien recubierto con el péptido correspondiente, que se incubó y se lavó. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado y al péptido/reactivo indicador se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato de HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

10

15

La Tabla 4 muestra los resultados de las muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* analizadas con el formato de ensayo indirecto. El control positivo (PC, ID 1049:16E) y el control negativo (NC, 3818:57B) fueron muestras de suero positivas y negativas conocidas de *E. canis*, respectivamente. Se determinó que las muestras eran positivas o negativas para el anticuerpo contra *E. canis* mediante el uso de la prueba SNAP® 4Dx®. Los resultados del ensayo se muestran para los ensayos con formato de placa de microtitulación realizados mediante el uso de reactivos peptídicos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

20

La Tabla 5 muestra los resultados de las muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* analizadas con el formato de ensayo directo. El control positivo (PC, ID 1049:16E) y el control negativo (NC, 3818:57B) fueron muestras de suero positivas y negativas conocidas de *E. canis*, respectivamente. Se determinó que las muestras eran positivas o negativas para el anticuerpo contra *E. canis* mediante el uso de la prueba SNAP® 4Dx®. Los resultados del ensayo se muestran para los ensayos con formato de placa de microtitulación realizados mediante el uso de reactivos peptídicos (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

25

Tabla 5. Muestras de campo positivas y negativas a *E. canis* analizadas mediante el uso del ensayo de formato de placa de microtitulación indirecta construido mediante el uso de péptidos P140 (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

30

	Muestra	4Dx® Resultados	Absorbancia a 650 nM		
			SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
	1049:16E (PC)		2,292	2,735	2,584
	3818:57B (NC)		0,051	0,065	0,045
EC+	HP 127	0,07	0,042	0,050	0,038
EC+	HP 143	0,08	2,867	2,825	2,731
EC+	HP 147	0,09	2,370	2,661	2,658
EC+	HP 151	0,21	2,176	2,093	2,535
EC+	HP 161	0,18	1,708	2,178	2,551
EC+	HP 165	0,08	2,690	2,492	2,525
EC+	HP 172	0,07	0,229	0,902	2,197
EC+	HP 185	0,38	2,497	2,622	2,704
EC+	HP 186	0,26	2,899	2,979	2,794
EC+	HP 188	0,40	2,482	2,578	2,898
EC+	HP 190	0,21	2,484	2,534	2,632
EC+	HP 192	0,18	1,473	2,132	2,526
EC+	HP 194	0,43	2,583	2,429	2,539
EC+	HP 197	0,22	2,150	2,239	2,537
EC+	HP 201	0,36	2,449	2,472	2,519
EC+	HP 206	0,10	2,477	2,247	2,549
EC+	HP 207	0,08	2,030	2,359	2,369
EC+	HP 209	0,20	0,262	0,218	1,102
EC+	HP 213	0,21	1,471	1,662	2,406
EC+	HP 215	0,19	2,144	2,431	2,721
EC-	HP 116	0,02	0,110	0,065	0,070
EC-	HP 119	0,02	0,102	0,091	0,079
EC-	HP 120	0,01	0,058	0,063	0,045

5	EC-	HP 121	0,02	0,054	0,064	0,057
	EC-	HP 122	0,03	0,053	0,059	0,040
	EC-	HP 124	0,02	0,055	0,061	0,052
	EC-	HP 128	0,02	0,068	0,072	0,054
	EC-	HP 129	0,02	0,056	0,057	0,044
	EC-	HP 130	0,01	0,049	0,048	0,039
10	EC-	HP 131	0,01	0,051	0,053	0,043
	EC-	HP 132	0,03	0,057	0,061	0,038
	EC-	HP 134	0,02	0,059	0,084	0,114
	EC-	HP 137	0,03	0,043	0,046	0,037
	EC-	HP 138	0,01	0,055	0,063	0,048
15	EC-	HP 139	0,01	0,064	0,062	0,056
	EC-	HP 140	0,00	1,574	2,444	2,491
	EC-	HP 142	0,02	0,065	0,068	0,069
	EC-	HP 144	0,02	0,080	0,079	0,081
20	EC-	HP 145	0,01	1,564	1,934	2,095
	EC-	HP 148	0,01	0,037	0,043	0,043

25 Tabla 6. Muestras de campo positivas y negativas a *E. canis* analizadas mediante el uso del ensayo de formato de placa de microtitulación directa construido mediante el uso de péptidos P140 (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

Muestra	3Dx® SNAP S-Bkg	Absorbancia a 650 nM				
		SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20		
30	1049:16E (PC)	0,72	2,753	2,079	2,018	
	3818:57B (NC)	Neg	0,034	0,035	0,036	
	1049:16A	<i>E. canis</i> pos	0,28	0,201	0,173	1,448
35	1049:16 G	<i>E. canis</i> pos	0,50	0,034	0,034	0,039
	1049:16Q	<i>E. canis</i> pos	0,39	2,308	1,933	2,151
	1049:16U	<i>E. canis</i> pos	0,56	0,627	2,038	2,254
	1061:03B	<i>E. canis</i> pos	0,49	0,083	0,338	0,889
40	1061:031	<i>E. canis</i> pos	0,27	2,766	2,593	1,646
	1177:21D	<i>E. canis</i> pos	0,15	0,042	0,046	0,126
	1177:21G	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,087	1,675	1,835
	1177:21K	<i>E. canis</i> pos	0,34	0,681	1,930	2,010
45	1177:63O	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,146	0,112	1,587
	1183:85A	<i>E. canis</i> pos	0,49	2,768	2,757	2,476
	1256:311	<i>E. canis</i> pos	0,23	0,044	0,086	0,143
50	813:91F	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,239	1,570	1,993
	813:911	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,212	0,517	1,646
	EC 10	<i>E. canis</i> pos	0,37	0,236	0,302	0,465

55 Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de una infección natural fue reactivo a los péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis*. (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

60 Ejemplo 10: Pruebas de sueros de perros positivos y negativos a *E. canis* conocidos mediante el uso de un inmunoensayo basado en placas de microtitulación preparado mediante el uso de los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24) obtenidos de la proteína p16 de *E. canis*. Los ensayos se realizaron mediante el uso del formato de ensayo indirecto al hacer uso del conjugado HRPO anticánico como el indicador.

65 Se obtuvieron sueros de seis caninos positivos a anticuerpos de *E. canis* y tres negativos a anticuerpos de *E. canis* de Sinclair Research (Columbia, MO). Se observó que las muestras de suero eran positivas o negativas mediante el uso del ensayo de unión cromatográfica de flujo reversible con licencia prueba IDEXX SNAP® 4Dx® para el anticuerpo de *E. canis*. Los resultados del ensayo cromatográfico de flujo reversible SNAP® se muestran en la Tabla 7.

Las muestras se analizaron mediante el uso de inmunoensayos basados en placas de microtitulación preparados mediante el uso de péptidos sintéticos (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24) derivados de la proteína de superficie p16 de *E. canis*. El péptido sintético se inmovilizó en los pocillos de microtitulación Immulon a 0,25 ug/ml (SEQ ID NO: 22 y 23, o a 0,5 ug/ml (SEQ ID NO: 24)). Se adicionó una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO) (dilución 1:2000) antiespecie, en este caso canino, lavado y adición del sustrato de HRPO. La absorbancia a 650 nm (A650) del fluido en pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

Resultados:

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

Conclusiones:

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

Tabla 7: Resultados del ensayo para muestras caninas positivas y negativas con el uso de pocillos de microtitulación recubiertos con péptidos sintéticos de *E. canis* (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24) y conjugado antiespecies como indicador. A650 es la absorbancia a 650 nm. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo cromatográfico de flujo reversible SNAP® 4Dx®.

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

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

Los sueros de siete caninos positivos a anticuerpos de *E. canis* y tres negativos a anticuerpos de *E. canis* se obtuvieron de perros de campo. Se observó que las muestras de suero eran positivas o negativas mediante el uso del cromatográfico de flujo reversible con licencia IDEXX SNAP® 3Dx® para anticuerpos de *E. canis*. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 8.

Las muestras se analizaron mediante el uso de un inmunoensayo basado en placas de microtitulación preparado mediante el uso de los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24) derivados de la proteína

de superficie P16 de *E. canis*. Los péptidos sintéticos se inmovilizaron en pocillos de placa de microtitulación a 1 ug/ml. Las cantidades separadas de los péptidos sintéticos se conjugaron con la peroxidasa de rábano picante (HRPO) indicadora. La muestra de prueba y el conjugado péptido:HRPO (1 ug/ml) se adicionaron al pocillo de microtitulación recubierto con péptido, que se incubó y se lavó. El anticuerpo de la muestra unido al péptido inmovilizado y al conjugado péptido::HRPO se inmovilizó en el pocillo de microtitulación. Este complejo se detectó mediante la adición de un reactivo de sustrato de HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

Resultados:

Los resultados de las muestras positivas y negativas se muestran en la Tabla 8. Las muestras positivas 813:911, 1049:16A, 1049:16U, 1061:031, 1177:21G, 1177:21K y 1177:63O fueron reactivas a las secuencias de péptidos mostradas en la SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24. Las muestras negativas 3818:57A, 3818:57C y 3818:57D no fueron reactivas a las secuencias de péptidos mostradas en la SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24.

Conclusiones:

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

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

Muestra	3Dx SNAP	Resultados de la placa (A650)					
		SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:24	
		A650	Resultados	A650	Resultados	A650	Resultados
1049:16E (PC)	pos	2,497	pos	2,908	pos	1,367	pos
3818:57B (NC)	neg	0,038	neg	0,041	neg	0,056	neg
813:911	pos	1,244	pos	1,828	pos	0,651	pos
1049:16A	pos	0,547	pos	0,819	pos	0,116	pos
1049:16U	pos	2,653	pos	3,531	pos	1,031	pos
1061:031	pos	0,665	pos	1,801	pos	0,127	pos
1177:21G	pos	1,484	pos	2,353	pos	0,444	pos
1177:21K	pos	2,612	pos	3,049	pos	1,077	pos
1177:63O	pos	0,290	pos	2,091	pos	0,215	pos
3818:57A	neg	0,039	neg	0,037	neg	0,041	neg
3818:57C	neg	0,038	neg	0,036	neg	0,042	neg
3818:57D	neg	0,037	neg	0,037	neg	0,040	neg

Ejemplo 12: Resultados del ensayo para sueros de 6 perros infectados experimentalmente con *E. canis* mediante el uso de placas de microtitulación con revestimiento de péptido sintético (SEQ ID NO:23) y conjugado anticánico como indicador.

ES 2 913 324 T3

Seis perros sin tratamiento previo se infectaron experimentalmente con el aislado de Luisiana de *E. canis*. Las muestras de suero se obtuvieron los días 3, 7, 10, 13, 17, 21, 24, 28 y 35 después de la infección. Las muestras se analizaron mediante el uso de inmunoensayos basados en placas de microtitulación preparados mediante el uso del péptido sintético p16-2 (SEQ ID NO:23) derivado de la proteína de superficie p16 de *E. canis*. El péptido sintético se inmovilizó en pocillos de microtitulación, se adicionó una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un conjugado anticainino, peroxidasa de rábano picante (HRPO) (dilución 1:2000), lavado y adición de sustrato de HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación.

Resultados:

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

Conclusiones:

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

TABLA 9. Resultados del ensayo con el uso para suero de perros infectados experimentalmente con el uso de placas de microtitulación recubiertas con el péptido sintético de *E. canis* (SEQ ID NO:23) y conjugado antiespecie como indicador. A650 es la absorbancia a 650 nm. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo cromatográfico de flujo reversible SNAP® 4Dx®.

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

ES 2 913 324 T3

	E3-6	d24	Neg	0,962	+	
	E3-7	d28	Neg	0,840	+	
	E3-8	d35	+ (.05)	1,303	+	
5	268830	E4-0	d3	Neg	0,037	N
		E4-1	d7	Neg	0,034	N
		E4-2	d10	Neg	0,038	N
10		E4-3	d13	Neg	0,112	+
		E4-4	d17	Neg	1,432	+
		E4-5	d21	+ (.05)	1,364	+
		E4-6	d24	+ (.05)	1,167	+
15		E4-7	d28	+ (.09)	1,412	+
		E4-8	d35	+ (.12)	1,986	+
	285307	E5-0	d3	Neg	0,036	N
		E5-1	d7	Neg	0,046	N
20		E5-2	d10	Neg	0,044	N
		E5-3	d13	Neg	1,018	+
		E5-4	d17	Neg	1,597	+
		E5-5	d21	+ (.05)	1,478	+
25		E5-6	d24	+ (.04)	1,282	+
		E5-7	d28	+ (.04)	1,329	+
		E5-8	d35	+ (.10)	1,838	+
	533573	E6-0	d3	Neg	0,037	N
30		E6-1	d7	Neg	0,035	N
		E6-2	d10	Neg	0,032	N
		E6-3	d13	Neg	0,909	+
		E6-4	d17	Neg	1,832	+
35		E6-5	d21	+ (.08)	1,883	+
		E6-6	d24	+ (.08)	1,964	+
		E6-7	d28	+ (.06)	1,963	+
40		E6-8	d35	+ (.15)	2,166	+

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

E. canis se cultiva en cultivo celular canino mediante el uso de los métodos descritos en la literatura. Ver Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol 42:362-368. Mediante el uso de microscopía óptica, se estimó que las células 030 se infectaron por *E. canis* por más del 80 %. Se recolectaron dos litros de cultivo celular infectado con *E. canis*, se centrifugaron y el sedimento retenido produjo 7,31 g de material (peso húmedo). Se supone que el agua representa el 80 % del peso del material, lo que da un peso en seco estimado de 1,462 g (20 % del peso del material). El sedimento celular se resuspendió a 20 mg/ml en PBS (peso en seco) para un volumen total de 73 ml.

A este sedimento celular resuspendido, se adicionaron 0,73 ml de solución de formalina (Catálogo Sigma Solución de formalina HT50-1-2 al 10 %, tamponada a neutral) para una concentración final de formaldehído de 0,04 %. La solución se agitó de 12 a 24 horas a 4 °C. La mezcla inactivada se centrifugó y el sedimento celular se conservó. El sedimento se lavó mediante resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recolectó mediante centrifugación y el lavado se repitió una vez.

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

Ejemplo 14: Preparación de *E. canis* inactivado con formalina con dos adyuvantes diferentes y protocolo para la inmunización de beagles con el antígeno de *E. canis*.

Para la inmunización en perros alojados en jaulas (beagles de laboratorio) se formuló el antígeno de *E. canis* inactivado en formalina con el uso de tres adyuvantes diferentes. El antígeno de *E. canis* inactivado con formalina se preparó con el adyuvante Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) mediante el uso del protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivada con formalina (peso en seco). Se preparó

una formulación adicional de inmunógeno mediante el uso de una combinación del adyuvante Ribí (descrito anteriormente) y el adyuvante BCG (1 mg por dosis) (Calbiochem de EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA). Dos grupos que consistían de tres perros cada uno se dosificaron 4 veces durante un período de 170 días (días 0, 14, 156, 170) mediante el uso de *E. canis* inactivada que contenía adyuvante Ribí solo o adyuvante Ribí y adyuvante BCG en combinación. En un esfuerzo por producir un estado hiperinmunitario inducido por la vacuna, todos los perros recibieron una dosis única (día 247) de *E. canis* inactivada con formalina formulada mediante el uso del adyuvante TiterMax® (CytRx Corp., Norcross, GA) o el adyuvante TiterMax® y el adyuvante BCG en combinación mediante el uso de las instrucciones del fabricante. A los perros se les administraron vacunas de acuerdo con el siguiente calendario:

ID del perro	Vacuna administrada / día de vacunación			
	<i>E. canis</i> / Ribí	<i>E. canis</i> / Ribí + BCG	<i>E. canis</i> / TiterMax	<i>E. canis</i> /TiterMax + BCG
CVYDEH	0, 14, 156, 170		247	
CWMBDC	0, 14, 156, 170		247	
CVXCSCM	0, 14, 156, 170		247	
CWMAXK		0, 14, 156, 170		247
CVSCVA		0, 14, 156, 170		247
CVXCAP		0, 14, 156, 170		247

El comité del IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de beagles de laboratorio. A todos los perros se les administró el artículo de prueba adecuado por vía subcutánea en el área dorsoescapular. En el día 0 se observó que los 6 perros eran seronegativos mediante el uso tanto del diagnóstico cromatográfico de flujo reversible SNAP® 3Dx® así como también como por el análisis de inmunotransferencia western mediante el uso del organismo *E. canis*. Los seis animales seroconvirtieron a una prueba positiva en el ensayo de *E. canis* cromatográfico de flujo reversible SNAP®3Dx® para el día 42. Los sangrados de producción se obtuvieron en los días 226, 261, 268 y 282. (aproximadamente 50 ml de sangre que produjeron aproximadamente 25 ml de suero).

Ejemplo 15: Análisis de sueros de beagles inmunizados con *E. canis* inactivado con formalina (muestras de vacuna) mediante el uso de un inmunoensayo basado en placas de microtitulación preparado mediante el uso de los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24) obtenidos de la proteína P16 de *E. canis*.

La preparación del *E. canis* inactivada con formalina y la inmunización de los beagles se describieron en los Ejemplos 13 y 14. Las muestras de beagles inmunizados se analizaron mediante el uso de los inmunoensayos basados en placas de microtitulación directas preparados mediante el uso de los péptidos sintéticos (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24).

Formato de ensayo directo

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

Resultados

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

TABLA 10. Resultados del ensayo con el uso de suero de perros inmunizados con antígeno de *E. canis* inactivado con formalina medido con el uso de placas de microtitulación recubiertas con el péptido sintético de *E. canis* (SEQ ID

ES 2 913 324 T3

NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24) y péptido sintético-conjugado como indicador. DO es densidad óptica. La columna "4Dx SNAP" presenta los resultados del ensayo cromatográfico de flujo reversible SNAP® 4Dx®.

Adyuvante	Muestra	4Dx SNAP OD / (resultado)	Resultados de la placa					
			SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:24	
			OD	Resultados	OD	Resultados	OD	Resultados
	1049:16E (PC)	0,72	2,276		2,865		1,021	
	3818:57B (NC)	neg	0,043	neg	0,044	neg	0,042	neg
Ribi	CVYDEH día 226	neg	0,038	neg	0,056	neg	0,037	neg
	día 261	0,07 (pos)	0,037	neg	0,046	neg	0,035	neg
	día 268	0,17 (pos)	0,045	neg	0,057	neg	0,038	neg
	día 282	0,18 (pos)	0,035	neg	0,048	neg	0,034	neg
Ribi	CWMBDC día 226	0,08 (pos)	0,050	neg	0,052	neg	0,043	neg
	día 261	0,45 (pos)	0,044	neg	0,090	neg	0,039	neg
	día 268	0,40 (pos)	0,039	neg	0,064	neg	0,038	neg
	día 282	0,30 (pos)	0,038	neg	0,058	neg	0,040	neg
Ribi	CVXCSCM día226	neg	0,034	neg	0,038	neg	0,042	neg
	día 261	neg	0,044	neg	0,073	neg	0,071	neg
	día 268	0,14 (pos)	0,042	neg	0,038	neg	0,041	neg
	día 282	0,23 (pos)	0,044	neg	0,038	neg	0,054	neg
Ribi + BCG	CWMAXK día 226	0,07 (pos)	0,038	neg	0,035	neg	0,039	neg
	día 261	0,26 (pos)	0,043	neg	0,037	neg	0,036	neg
	día 268	0,36 (pos)	0,045	neg	0,043	neg	0,034	neg
	día 282	0,34 (pos)	0,038	neg	0,036	neg	0,034	neg
Ribi + BCG	CVSCVA día 226	10 (pos)	0,039	neg	0,036	neg	0,041	neg
	día 261	0,51 (pos)	0,041	neg	0,036	neg	0,036	neg
	día 268	0,45 (pos)	0,043	neg	0,035	neg	0,035	neg
	día 282	0,47 (pos)	0,036	neg	0,037	neg	0,036	neg
Ribi + BCG	CVXCAP día 226	neg	0,041	neg	0,036	neg	0,034	neg

	día 261	0,51 (pos)	0,054	neg	0,046	neg	0,047	neg
5	día 268	0,42 (pos)	0,041	neg	0,045	neg	0,043	neg
	día 282	0,48 (pos)	0,035	neg	0,034	neg	0,036	neg

Conclusiones

Los resultados demuestran que los anticuerpos inducidos como resultado de la inmunización mediante el uso del antígeno de *E. canis* inactivado con formalina fueron reactivos en la prueba cromatográfica de flujo reversible SNAP® 4Dx®, que indicaría que se inició una respuesta de anticuerpos anti-*E. canis*. Estas mismas muestras no fueron reactivas a los péptidos sintéticos derivados de la proteína P16 de *E. canis* (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24).

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

Ejemplo 15:

Controlar el tratamiento de la infección por *E. canis*.

Seis perros se infectaron experimentalmente con *E. canis*. La doxiciclina se administró 28 días después de la infección. Los anticuerpos específicos para *E. canis* se detectaron mediante el uso de la SEQ ID NO:23 con un protocolo de ensayo indirecto. Los polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO:23 se inmovilizaron en pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se adicionó una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO) (dilución 1:1000) antiespecie, en este caso anticanino de conejo. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó mediante el uso de un lector de placas de microtitulación. El valor de corte negativo fue 2 veces el valor de O.D. del control negativo.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Los perros E-1, E-2, E-3, E-4, E-5 y E-6 se infectaron experimentalmente con *E. canis*, pero no se trataron para la infección. La Figura 8 demuestra que el nivel de anticuerpos que se unen a la SEQ ID NO:23 aumentó considerablemente después de la infección experimental y no disminuyó durante el curso de tiempo del experimento. Los perros EDTx-1, EDTx-2, EDTx-3, EDTx-4, EDTx-5 y EDTx-6 se infectaron experimentalmente con *E. canis* y después se trataron con doxiciclina a los 28 días después de la infección. La Figura 8 demuestra que el nivel de anticuerpos que se unen a la SEQ ID NO:23 aumentó considerablemente después de una infección experimental y disminuyó después de la administración de doxiciclina. Por lo tanto, la SEQ ID NO:23 puede usarse para monitorear la progresión, la respuesta al tratamiento, o la eficacia del tratamiento de la infección por *E. canis*.

Ejemplo 16

Diferenciación de los perros que se vacunaron contra *E. canis* y los perros que se vacunaron contra *E. canis*, pero se infectaron con *E. canis*.

Las vacunas pueden no ser completamente eficaces para prevenir infecciones. Por lo tanto, es conveniente tener un método para determinar si un animal vacunado se infectó a pesar de la vacunación. Los inmunoensayos que usan p16 como agente de detección no detectan anticuerpos anti-*E. canis* en perros que se vacunaron contra *E. canis* y que no se infectaron con *E. canis*. Ahora se descubrió que una proteína p16 de *E. canis* (SEQ ID NO:10) puede usarse para detectar la infección por *E. canis* en perros que recibieron una vacuna contra *E. canis*.

Seis perros que se vacunaron contra *E. canis* y dos perros no vacunados se retaron con células K9 infectadas con *E. canis* en DMSO al 10 %. Cada perro se probó con el tiempo para anticuerpos anti-*E. canis* con un inmunoensayo que comprende la SEQ ID NO:10. Todos los perros vacunados y los dos perros de control se infectaron con *E. canis*. Las infecciones por *E. canis* se confirmaron con dos marcadores de infección independientes. Los inmunoensayos fueron capaces de detectar la infección por *E. canis* en los perros vacunados y no vacunados. Todas las señales de inmunoensayo estaban significativamente por encima de las señales de fondo. Ver las Figuras 9A-B, 10A-C y 11A-C.

ES 2 913 324 T3

Secuencias:

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

ORIGEN

1 ATGGATATTG ATAACAATAA TGTGACTACA TCAAGTACGC AAGATAAAAG TGGGAATTTA
61 ATGGAAGTGA TTATGCGTAT ATTAATTTT GGTAAATAATT CAGATGAGAA AGTAAGCAAT
121 GAAGACACTA AAGTTCTTGT AGAGAGTTTA CAACCTGCTG TGAATGACAA TGTAGGAAAT
181 CCATCAAGTG AAGTTGGTAA AGAAGAAAAT GCTCCTGAAG TTAAAGCGGA AGATTTGCAA
241 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
301 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
361 GGTAGTATAG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTAAAAC TAGTAAAGAG
421 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTGGAA
481 CATTCAACAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAATACTCCT
541 GAAGTTAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
601 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TAAACTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCA
661 GAAGATTGCG AACCTGCTGT AGATGATAGT GTGGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
721 AAAGTATCTG AAAGTAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAAGCAGA AGATTTGCAA
781 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT GGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGAGAAAA AGTATCTAAA
841 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
901 GATAGTGTGG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAG
961 GAAAATACTC CTGAAGTTAG AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGG TAGTGTAGAA
1021 CATTCAACAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAGTACTCCT
1081 GAAGTTAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATAGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
1141 GAAGTTGGGA AAAAAGTATC TGAAACTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCA
1201 GAAGATTTGC AACCTGCTGT AGATGGTAGT GTAGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
1261 AAAGTATCTG AAAGTAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAAGCAGA AGATTTGCAA
1321 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGAGAAAA AGTATCTGAA
1381 ACTAGTAAAG AGGAAAATAC TCCTGAAGTT AAAGCGGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
1441 GGTAGTGTAG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAA
1501 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTAGAA
1561 CATTCAACAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAAGA AAGTACTCCT
1621 GAAGTTAAAG CGGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTGTGGAACA TTCATCAAGT
1681 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TGAGACTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCG
1741 GAAGTACAGC CTGTTGCAGA TGGAATCCT GTTCCITTTA ATCCTATGCC TTCAATTGAT
1801 AATATTGATA CTAATATAAT ATTCCATTAC CATAAAGACT GTAAAAAAGG TTCAGCTGTA
1861 GGAACAGATG AAATGTGTTG TCCTGTATCA GAATTAATGG CTGGGGAACA TGTTCATATG
1921 TATGGAATTT ATGTCTATAG AGTTCAATCA GTAAAGGATT TAAGTGGTGT ATTTAATATA
1981 GATCATTCTA CATGTGATTG TAATTTAGAT GTTTATTTTG TAGGATACAA TTCTTTTACT
2041 AACAAAGAAA CAGTTGATTT AATATAA

ES 2 913 324 T3

SEQ ID NO:2 secuencia de proteína del antígeno de 120 kDa
ORIGEN

```
1 MDIDNNNVTT SSTQDKSGNL MEVIMRILNF GNNSDEKVSN EDTKVLVESL QPAVNDNVGN
61 PSSEVGKEEN APEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGKKVSE TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
121 GSIEHSSSEV GEKVSKTSKE ESTPEVKAED LQPAVDDSV E HSSSEVGEKV SETSKEENTP
181 EVKAEDLQPA VDGSIHSSS EVGEKVS KTS KEESTPEVKA EDLQPAVDDS VEHSSEVGE
241 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS K TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
301 DSVEHSSSEV GEKVSETSKE ENTPEVRAED LQPAVDGSVE HSSSEVGEKV SETSKEESTP
361 EVKAEDLQPA VDSSIEHSSS EVGKKVSETS KEESTPEVKA EDLQPAVDGS VEHSSEVGE
421 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVSE TSKEENTPEV KAEDLQPAVD
481 GSVEHSSSEV GEKVSETSKE ESTPEVKAED LQPAVDDSV E HSSSEVGEKV SETSKEESTP
541 EVKAEDLQPA VDGSEHSSS EVGEKVSETS KEESTPEVKA EVQPVADGNP VPLNPMPSID
601 NIDTNIIFHY HKDCKKGS AV GTDEMCCPVS ELMAGEHVHM YGIYVYRVQS VKDLSGVFNI
661 DHSTCDCNLD VYFVGYSNFT NKETVDLI .
```

SEQ ID NO 3 secuencia de nucleótidos del antígeno de 200 kDa del 1081 al final
ORIGEN

```
1 AATTTAGAT TTTGGACTTG TAGATGGAGA TGGTAAAAAT CCTTTACATC ATGCTGTTGA
61 ACATTTGCCA CCGTTTATAC TTAAGGGCGT AATGGACCAT GTAAAAAATA GTAGTGAGTT
121 TCAAGATTTA GTAAATGATC CTGATTATTT TGGAAATACT ATAGCTCATT ATGCAGTTAA
181 GAATAAAAAAT GCTGATTTAA CATTGTTTAA CATGCTGAAA GCTTCAGGAG CTGATTTAAA
241 TGTTAGGAAT GTAGTTGGTC GAGCTCCAAT ACATGTTGCT TCTTCTAATG GTAAGGCTAA
301 TGCAGTTTCT GGACTTGTAT CATGTGGTAT TGACGTTAAT TCTCAAGATG TGAATGGAGA
361 TACACCACTT CATATTGCTG TTGAAGGCGG TAGTATGGAG ACGGTATTAG CAGTGTTAAA
421 TCAGAGAGGT GCTGATGTTA GTGTCCAGAA TAACGATGGA GTTACACCTA TGCTTAGTGC
481 TGCTAAATAT GGAGATATAG GTGTAATAAA AGCTTTAGGT TCAGCTAAAC CAAATATTAA
```

ES 2 913 324 T3

541 AGGTGAAGAC ACTGTTGCTA AATCATTGCT GATGGAGGAT TACAAAGGTT TTACACCCTT
601 GCATTTTIGTA GCTGGTGGTG GTAGCAGAGA TACATTCCGT GTCGTAAGAA AAAATTATGA
661 AAAATGTCAT GACTTAGCTA CTATTAGGGC AGCTTTAATG CAAGATAGAA GTGGTGGTGA
721 GCTTGAAAT TTAGGGGATT TTGAAAGTGA AAATATATTG GGTTGCGCAA ATGCAAAATT
781 CTTGCAGCAT ATTCAATCAG CAAATTTTGG TTTTCTCCA GCGCATTGTG CTATAGTATC
841 GTCTAATCAC AATGTAATGA AAGATATCTT AAATTTTGT GGGGATTCGT TACACCTACC
901 AAGTGAGCGT GGGTATAATG CAATGCAGGT TGCTGCTTTG TTTGGTGACA AAGAAGCAGT
961 GAAAAATGCTT GCTAAAAGTG CTAAGCCAAG TGATCTTAAT TTTAAGACTT CAGCAACTCC
1021 TACTCCGTTA AATCTTGCAT GTCTTAGAGG TGATAATGAG GTAGTACGTG GGTTAGTAGG
1081 TCAACATGGT ATTGACATTA ACCAACGTAT GGGAAAGTAT AAAAACACTG TATTGCATTA
1141 TGCAATCAGC AAAGGAGATA GTTTTCTTGT GCAAAAGATA TTAGCTCATA CTGGAGTTGA
1201 TGTTAATTGT GAGAATAACC TAGGTCAAAC GCCTTTACAT TTAGCAGTTG AGGGAGGAGA
1261 TCCTAAGATA GTATCTTCTC TTCTTAAAGC TGGTGCAGTA GTTAATCGTC TGGATGATAA
1321 TGGTAGATCT GTACTTTCTT CTGCGATAGT TCCAGGTAGA AAAGAAAAGG GAGTGTCTGGG
1381 TATAGTTAAT AAATTGCTGG ATAGAGGTGC AGATATTAAT TTAGATGGAG ACCACAATAT
1441 ACTTTTTGAT CAGTGTCTAA GGGGTGGATA TAATAATGTA TTAGATAAGT TAATACAACA
1501 AGGGGTTGAA GTTAAATCGAA ATAGTGAAAT ACGTCCAATG GTTTAATGCTG CAATATCTGG
1561 TAATGAGCAT GCTATCAAAT CATTAGCTAA TGCTGGTGGG GATGTTAATG AAGTAGTAAA
1621 TAATCCATCT AGTAGGCATT CAGGAAATCC TTTAATTATG GTTGCAGTAG CAGATGGTAA
1681 TGCAGGTCTT CTTAAAACAT TAGTTTCTGA AGGATGTGAT GTTGGTAAAT CTGGAAAAGA
1741 TGGTAATACA GCGTTACATT ATGCTGTTAG TCATTCAGAT AAAGAGTTTG GTAATAAAGC
1801 TATAAGATA TTAATTTTAC GTAATAGTGT TGGGACTAAT AGAGATATTC TTACTCAAAA
1861 GAATAACGCA GGTGATACAC CTTTACATGA AGCTCTTAAG TCAGGTAATA TTAATTCTGT
1921 ACAGAATATC TTAAGTGCTG TACATCCAAG ATACGCAAAG GAGATATTA CAGCCAGAGA
1981 CAAAGAAGGG TACACACCAA TGCATTATAC TGTGGAGTA AATAATGTTG ATGTTGGTAG
2041 AAGTATTCTA GAGTCTATGC TCTCTAAAGG TGGAATAAT CTTGGAGAGA TTGTTGGAGC
2101 ACAGGATAGT AATTTTCGAA CACCTCTGCA TGCTGCTATT AAAATATCTG ATTATCTGTC
2161 TGCGGACATG ATAATAGGTA GCTTATCGAA AACAGAATTG TCAAAGTTAT CGCAATTAAC
2221 AGATATTAAC GGGGATACAC CACTACATCT TTCTTGTCAG TCTGGTAATG TCGAGATGAC
2281 ACAATTCTTT CTTGGAGGTT TGGATAAACG TGAATTACCT AAGACATTA AGATAGCAAA
2341 TAAAAATGGA GATACTCCTT TACATGATGC TATAAGAAAT GATGATATTA AATCTGCAAA
2401 AATGATGATT AGGAATTGTA ACAAAGAAGA ACTTGCTAAT GTATTAATAA GTAAAGATAG
2461 TTTTGGTAAT ACAGTATTGC ATACTATTGC TGACCAAGTT ATTGCGAATC CAGAATCAAA
2521 GAAAGACCTT GATGGTTTGA TGAATTTAGC AGTGAAAAGG CTAAGAATC AAGATCTGAA
2581 AGATCTAGTT AATACGCGAA ATAACCTGA CGATACTGTT GCACATTGTG CTCTTTTATC
2641 GGATATGAAA TATGCTCAAA AGATACTTAA ATCATGTAAC CATGATACAT TAGTGAGAGG
2701 AAATAGTAAT AATCAATCTT TATCAGAGTG TATTCGTGAT GATAGTAAAT ATAAAAAGG
2761 TGAATTTTT AGTAAGTCTT TATTTTCAA ATTAAGAAA CTTGAGGCAC GAGCTGCCAG
2821 CGCTAGTTAT GAAGAATTAT CTAGTATCAG TAGTGGTAGT GATGTTTCTT CTGTATCAAC
2881 AAATAGCACA GAAGTAAGTG CAGTACCTGA AGTGGCAAGA AGTAGTGGTG CTGTGTCGTT
2941 CAAACATGTG CAAGAAACAG GAGTTGACAC GTCTGGTCCT TCTGATATAG AAAGTTTAGA
3001 GAGATTATCT GATACTAGTC TTGGGTCAA TGATTTTGT CAGCGAATGG CAGATTTAGA
3061 TCAAGAAATA GCAAATATTG TTAGTGGTTT ACCAGAAGTT ACCCAGGTAG CTGTAAAGTCA
3121 ACAACAAGCA GCATCTCCTA GTTCAGGTCA AGCTGCTGGT GTGCAACAAA AAGAGATGCA
3181 GAGATAA

ES 2 913 324 T3

ORIGEN

1 NLDGFLVDGD GKNPLHHAVE HLPVILKGV MDHVKNSSSEF QDLVNDDYF GNTIAHYAVK
61 NKNADLILFN MLKASGADLN VRNVVGRAPI HVASSNGKAN AVSGLVSCGI DVNSQDVNGD
121 TPLHIAVEGG SMETVLAVLN QRGADVSVQN NDGVTPMLSA AKYGDIGVIK ALGSAKPNIK
181 GEDTVAKSLL MEDYKGF TPL HFVAGGSRD TFRVVRKNEY KCHDLATIRA ALMQDRSGGE
241 LVNLGDFESE NILGSPNAKF LQHIQSANFG FSPAHCIAVS SNHNVMKDIL NFGDLSLHLP
301 SERGYNAMQV AALFGDKEAV KMLAKSAKPS DLNFKTSATP TPLNLACLRG DNEVVRGLVG
361 QHGIDINQRM GSDKNTVLHY AISKGDSFLV QKILAHTGVD VNCENNLGQT PLHLAVEGGD
421 PKIVSSLLKA GAVVNRLDDN GRSVLSSAIV PGRKEKGLV IVNKLDRGA DINLDGDHNI
481 LFDQCLRGY NNVLDKLIQQ GVEVNRNSEI RPMVYAAISG NEHAIKSLAN AGGDVNEVVN
541 NPSSRHSGNP LIMVAVADGN AGLLKTIVSE GCDVKGSGKD GNTALHYAVS HSDKEFGNKA
601 IKILISRNSV GTNRDILTQK NNAGDTPLHE ALKSGNINSV QNILSAVHPR YAKEILTARD
661 KEGYTPMHT VGVNNDVGR SILESMLSKG VNNLGEIVGA QDSNFRTPH AAIKISDYRA
721 ADMIIGSLSK TELSLSQLT DINGDTPLHL SCQSGNVEMT QFFLGLDKR ELPKTLKIAN
781 KNGDTPLHDA IRNDDIKSAK MMIRNCNKEE LANVLKCKDS FGNTVLHTIA DQVIANPESK
841 KDLGMLNLA VKRLKNQDLK DLVNTRNNSD DTVAHCALLS DMKYAQKILK SCNHDTLVRG
901 NSNNQSLSEC IRDDSKYKKG GIFSKSLFSK LKKLEARAAS ASYEELSSIS SGSDVSSVST
961 NSTEVSAPPE VARSSGAVSF KHVQETGVDI SGPSDIESLE RLSDTSLGSN DFDQRMADLD
1021 QEIANIVSGL PEVTQVAVSQ QQAASSSSGQ AAGVQKEMQ R.

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

1 AATTATGCTG AAACACTTT ATCATTGGT GAATCTCGAG CAGAAGGACG TGAATCTCCA
61 TCAAGTGCAT TTGTTCAAAC TGGTCAATCA GAAGTACCTC GGAGTGAGGC TGCAGAGCCA
121 TTAATCAAT TTCCTCATGA TGAAGAAAGT ACTGCATTAG GTTCTCAAGC AACTATGACA
181 GGAGTGCTA CTCAGGCTAG TCCGTCAGCA GCATATCAGG ATGATAGTGA AATATCACGT
241 ATGAGGTCTA TGGCAGGAAC ATCTGCTCAA GCTGATCAAT CAGCAGTACA TCGTCGGAGT
301 GGTACAGCAT TAGAGCCATT AATTGAATTG CCTGATGAAG AAGAAAATGC TGCATTAGAT
361 TTTCAAACAG CTATGACAGG AGTGCCTACT CAGGCTAGTC CGTCAGCAGT ACATCGGAGT
421 GGTGTTGCAT CAGATCCTAC GCTACCTGAT GATGAAAGAA TTGATGTTCC ATCAGTTTCA
481 TCTCAAGTTG TAAGACCTTT TAGTGATGGT GAAGATTATT CAGTATATGA TAAATCAGGT
541 GTAGTAAGTG GTCATGAAAG ACCTGTTTCT TCTAGAGATT CAAGACAATT GGATGCATTT
601 GGTGATCCAT CAGATGATTT ATTGCCGGAG AGTGAAATTA TTGTTAGCAG CAGTAAGAAA
661 GCAATATTAG ATAGCCAAAA TGAAATAGAA TCTCTTATTC AGAGTGGAGA TACTTCTAGA
721 TGTATTAGGG CAATTAATAG TGCTCCTAGT GCGTCAGTGT TTCAACTGAA GACTTTATCG
781 AATGATATAT CTATTGCTGG ACGTGCTTTT TTAAATGGTA ATATTGATTT AATAGAAGCT
841 TGTATGAATT CTGGCAAGAA ATTAAATCCA AATATTACTG ATAATGAAAA AAATACTCTA

ES 2 913 324 T3

901 TTACATCAAT TTGTAGGATA TTTTGAACGC GATCCGAGAA TGTTGCTTGA TGCAGGAATG
961 CGTAACTGT TTTTGAAGATT ATGCATGGAT TATGGTTTCG ATATTAATCA TAAAAATAGT
1021 AATGGTAATA CAGTACTTGA TAGATTAAT GATTTAGTAG AAGGGTTAAG TAGTTCGCAA
1081 GTTGATCTTG AAAGTAGTGG TATTGATGAG TTTATGATCT CATTGTTAGC TCATTCTAGA
1141 ATGAGTGATC AAGCAGTAAA GAATATTGCT ACTGCGCAAA ATGAGTTTTT TGCACGTGAT
1201 TCTGTTTATA ATATTAGTCG TTTAGTTGAT ACTTCTATAG TTTTGCAGAA TAAATTGAGT
1261 GAAGTATTTT ATGAAGTCTG TGGACGTATT TTATCTGAAG AAGCTGGTAA ACATAAGGGT
1321 GTTGCTGAAG CAAATTATTC AAGATTGAAT AAAATATTAA ATGATGAATG TCTTAGAAAG
1381 ACTTTAGCTA ATACAGATGC CGATGAAAAT AATGTTTTAC AGAGATTGTG TCAAGATATT
1441 GCTTCTGGAA AAATCAATGC TCGTGATGAC AGAGTATTAA AACTTTTTGA GACAATTATA
1501 TCTAATTTAA AAGACAAAAGA TAAAGCATT CTAGAGGATT TATTATTTAA TAATAGAAAC
1561 TCAAGATTTG AAAATTGCAT TGAAGCTATA CCACGTATTC CTGGTGCCGA TGCTCTATTT
1621 AAAAACTAG AAGAGTTATT ATTAATAAAG AAAATAGCAG AGTCTTGTGA TTTTAATTCT
1681 ATGTTAGTGA ATTGTGCTGA GTCTGCTAAT GATAATTTAT ATAATTACCT GCGCACTAAT
1741 TATGCAGTTA TTGGTATAAA TAACGTAGAT ATAAATGGCA ATTCATCCCT ATGTAAAGCT
1801 GTTGTTACTG GGTCACAAGG TATTGTTAAA GCAGTATTAT CAACTGGAAC TAATATTAAT
1861 AGGAAAGATA AAAATGGTAA TACACCTTAA CATGCATTGT TAATTTTTAT GATGCTAAC
1921 CCTGAACTTG TCAAGGAGCA ACATATTTCA CTTGTGAAAT TCTTAGCGTC TCGTGGAGCT
1981 TTACTTAATG TAAAAAATAA TATGAATATT TCTCCAATTA TGCTTGCAGA ATCTATTGAT
2041 AAGAAAGAGG AACTTGCTAA GAAATTTACA AATCAAAAAG TTAGTATTTT AGAATCTTTA
2101 ATAGCTGGTA GTGAAGAACA TTTAGGGCTT AAATCCAAAT GTATATCTGA GTTAAAGCCT
2161 TATATAGAAT TAGGAAAAGG CATGAAGTAC GAAGATATAC ATGCTGATGT AATAGGTGGT
2221 GTATTATCTG CTGATATGTG TAATGCTAGA TTGCAGATAG GTAAATTATT AAATGGTGAT
2281 TTTTGTAAG AAAATGAATT AAAGACAGTA AAATTTAATT TTTCTGATAC AAATAAGGGT
2341 TATGTACAAA ATGTTGGTAA AAAAAGAAAT TAT

SEQ ID NO:6 ATPasa - Secuencia de proteína del fragmento de clon 84 ORIGEN

1 NYAETTLSEF ESRAEGRESP SSFVQTGQS EVPRSEAAEP LIQFPHEDES TALGSQATMT
61 GVSTQASPSA AYQDDSEISR MRSMAGTSAQ ADQSAVHRRS GTALEPLIEL PDEEENAALD
121 FQTAMTGVPT QASPSAVHRS GVASDPTLPD DERIDVPSVS SQVVRPFSDG EDYSVYDKSG
181 VVSGHERPVS SRDSRQLDAF GDPDSDLLEP SEIIVSSSKK AILDSQNEIE SLIQSGDTSR
241 CIRAINSAPS ASVFQLKTLN NDISIAGRAF LNGNIDLIEA CMNSGKKLNP NITDNEKNTL
301 LHQFVGYFER DPRMLLDAGM RNLFRLRCMD YGFDINHKNV NGNTVLDRLN DLVEGLSSSQ
361 VDLESSGIDE FMISLLAHSR MSDQAVKNIA TAQNEFFARD SVYNISRLVD TSIVLQNKFS
421 EVFYEVCGRI LSEEAGKHKG VAEANYSRLN KILNDECLRK TLANTDADGN NVLQRLCQDI
481 ASGKINARDD RVLKLFETII SNLKDKDKAL LEDLLFNRRN SRFENCIEAI PRIPGADALF
541 KKLEELLK KIEESCDFNS MLVNCAESAN DNLYNYLRIN YAVIGINNVD INGNSSLCKA
601 VVTGSQGIVK AVLSTGTNIN RKDKNGNTPL HALLIFMSN PELVKEQHIS LVKFLASRGA
661 LLNVKNNMNI SPIMLAESID KKEELAKKFT NQKVSILESL IAGSEEHGLG KSKCISELKP
721 YIELGKGMKY EDIHADVIGG VLSADMCNAR LQIGKLLNGD FCKENELKTV KFNFSDTNKG
781 YVQNVGKKRN Y

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

ES 2 913 324 T3

1 GTAAAAAAT TAAGATTATT ATTA AATTCA ATAAGTGAGT TACCGCAAGA ATTAAAAGAT
61 CAAATTTTAA GTACTAGAAG TACTATAGAT AAATTACGAA ATAGAATTAA TGCCITGCATA
121 AAGTCTGACG ATAGAGAAGG TATTGCACAT GCTGTAGAAT CTATGGCTAG TTCTTATTGT
181 GAATTATTAG GACATTGTAG ATTAATTTTT AAGAAATTAT ATGATGAAAA TGCTGATAAA
241 AGTTTGTCTAG AATTATGTAT TAAAGAATAT CAATCTGATT TAAACAAATT ATTGGAACAA
301 GGTATTGATA TATGTGCTTC AGAAGTCTCA TCAGAATGTA AGGATTTAGT TTGTAAAGTA
361 TGTGAAGATG AATTTGAGAA ATATGACTCT TTAICTAAAG TACAAAGATT CAGGGAATTA
421 TCTGGTGAAG TTGCTGATTT GGATGATAAA TTAACAAGAA GGGCTTCTTT TGTTGAGACT
481 TTTGGATTAT TTAGCAGTAG ATTAAGACAT TATAGGGAAA TTTTAGGAGA TGGTGATTTA
541 AAATTTTCGAG AGAGGATAGT TGAAAAATAT CAAGAGGATT TAAAGGAATT ATTAGAATTA
601 TCTGTTGATC TTCATTTGTT AATAAATTTA CCAGCATTAG AAGATTTACG CGATCATAGA
661 AATTTAGTGC ATAGAGCATG TAATGCTGAA ATTGAAAAAT ATCTAACTTT ATTTGATGAT
721 CAACAATTAC GTACATTATC GCAAGAAGTG AATAATGCTC ATGGTGAATT GATACAGATG
781 TTTTCTAAGT TTAGTATATT TGTTGATGGC GTTACTGGTA TTGAACAGAG CACATCTCAA
841 GTAGAGCACC CTCGTTCTGA TATTGCTAAA AGAGATACTA CAACACCAA GCAACGTGTT
901 GTGCAAGGTA AAGATGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTGA TAGTAAATAC
961 GGTGATGATG ATAGTAAAA AGCATCAGTT AGTGCACCTG CTGTTGACCA AGTTGTACCT
1021 GTAGCTGATG TTCAACCTGA ACCTCAGCTA GGTGAAGGAT TGGAAACATT AGAGTCTAGT
1081 ATAGCTGAAG GACCTGAGTT GCCITGGTGT GCATCTACTG CTAAGCAATC TATACCTTTT
1141 GCGATAACAC CATCAAGTCC TGAGACAGTT GATGAAAAAC TTGAAAGTTC TGGTGTAGT
1201 CAAGATGGTA TTACAACACC AGGACAACGT GTTGTGCAAG GTAAAGATGA TATACAATCT
1261 AGTGATAGTG ATAGTGATAG TAAATACGGT GATGATGATA GTAAAAAAGC ATCAGCTAGT
1321 GCACCTGCTG TTGACCAAGT TGTACCTGTA GCTGATGTTT AACCTGAACC TCAGCTAGGT
1381 GAAAAATTGG AAACATTAGA GTCTAGTATA ACTAAAGGAC CTGAGTTGCC TGGTGATGCA
1441 TCTACTGCTA AGCAATCTAT ACCTTTTGCG ATAACACCAT CAAGTCTGTA GACAGTTGAT
1501 GAAAAACTTG AAAGTTCTGG TGTTAGTCAA GATGGTATTA CAACACCAGG ACAACGTGTT
1561 GTGCAAGGTA AAGATGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTAA ATACGGTGAT
1621 GATGATAGTA AAAAAGCATC AGCTAGTGCA CCTGCTGTTG ACCAAGTTGT ACCTTCTGAC
1681 ACTCGTGCAG ATGGAGTATC AGAACCATTA GCATCTCATG TGGATCAAGG ATCTGATGTA
1741 CCTGGTGATG CATCTGTTGA TGGTGTGAT TTAAGATTAG GACGGTTATC TACTGAGCAA
1801 AGTGGATTGT TGCCACGTCA TGAACAAAA GTAAAGAGCAT TTATTTTAGA ACAGAGTTTG
1861 TTAGATCAAT TATATATGGA CTATATAGAT TTACACCCTG ATCAGAAAAG TTGTGAAGCT
1921 TATAATTCAG CATTGCATGG ATATAATACA AGATTAGAGT TACAGAAGGA ATATAACAGG
1981 ATTTTGAAT CACATGAATC AGCATCTCCA AATGAAATTA ATAGTTTTTC AAAAAATAT
2041 AGAGCAGCAT TAAGAGATGT TGCGCAGGAT ATTGTTAATC AGGGTCCAAT GTTTTATTCT
2101 TCTAGAGATG CAATGCTATT AAGGGCTAGA GTAGACACAT TGTGTGATAT GTGTCGTTCA
2161 ATACGTAATC TGTATATGGT TGAATTAGAT GCCATAGATA AAGAAGAAAA ATCGTTACAA
2221 TCTGATATGA AATCTGCAAG TTCTAGTGAT AAAAAATTGA TACAAGAAAA AATAAATTA
2281 CTT

ES 2 913 324 T3

1 VKKLRLLLNS ISELPQELKD QILSTRSTID KLRNRINACI KSDDREGIAH AVESMASSYC
61 ELLGHCLRLIF KKLYDENADK SLELELCIKEY QSDLNKLLEQ GIDICASEVS SECKDLVCKV
121 CEDEFEKYDS LSKVQRFREL SGEIADLDDK LTRRASVET FGLFSSRLRH YREILGDGDL
181 KFRERIVEKY QEDLKELLEL SVDLHLLINL PALEDLRDHR NLVHRACNAE IEKYLTLFDD
241 QQLRTLSQEV NNAHGELIQM FSKFSIFVDG VTGIEQSTSQ VEHPRSDIAK RDTTTPKQRV
301 VQGKDDIQSS DSDSDSDSKY GDDDSKKASV SAPAVDQVVP VADVQPEPQL GEGLETLESS
361 IAEGPELPGD ASTAKQSIPF AITPSSPETV DEKLESSGVS QDGITTPGQR VVQKDDIQS
421 SDDSDSDSKYG DDDSKKASAS APAVDQVVPV ADVQPEPQLG EKLETLESSI TKGPELPGDA
481 STAKQSIPFA ITPSSPETVD EKLESSGVSQ DGITTPGQRV VQGKDDIQSS DSDSDSKYGD
541 DDDSKKASASA PAVDQVVPD TRADGVSEPL ASHVDQGSVD PGDASVDGVD LRLGRLSTEQ
601 SGLLPRHEQN VRAFILEQSL LDQLYMDYID LHPDQKSCEA YNSALHGYNT RLELQKEYNR
661 IFESHESASP NEINSFSQKY RAALRDVAQD IVNQGPMFYS SRDAMLLRAR VDTLCDMCRS
721 IRNLYMVELD AIDKEEKSLQ SDMKSASSSD KKLIQEIKL L

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

1 ATGTTACACG TTCAAAATCA TGTTGATCAA CATACAAATC ATATAGAACA TGATGATTAC
61 CATTCTACTG GTCCTACTAG TTTTGAAGTT AATCTTTCTG AAGAAGAAA AATGGAGTTA
121 CAAGAAGTAT CTTCTATTGA TAGGTGATGA TGCGAAGATT GTGATCCAAA TTGTCGTTAT
181 CCTTTAGAAT TAGTAGAATG TCAGCGTATT GAGGAAAGAC CAGTATGCAA TGCAGGTTTA
241 GAGAGCTTGA CTGTTGATGC ATATCAATTA GGATTGTTGT TAGGTGGTTT TTTAAGTGCT
301 ATGAATTACA TATCTTATAG CTATCCTTGT TATTATTATG ATTGTTGTGA TAGAAATTAT
361 TACGACTGTT GTCATAAGAA TCGGTGTTAT TACAACCTGTT GTGATTGTGC GTAA

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

1 MLHVQNHVQD HTNHIEHDDY HFTGPTSFEV NLSEEEKMEL QEVSSIDSVG CEDCDPNCRY
61 PLELVECQRI EERPVCNAGL ESLTVDAYQL GLLGGFLSA MNYISYSYPC YYYDCCDRNY
121 YDCCHKNACY YNCCDCA.

SEQ ID NO:11 Secuencia de nucleótidos de la proteína Ribosomal L1 ORIGEN

1 ATGACGATT TCTTAGAAAAG TGATGATGAT AAGAGTAACT TTAAGAAGAC ATTGGAGAAC
61 GGTACTAAAG ACAAGACAAA TCTAGATAAT ACITATTATG ACTATCATCA TGAAGATGAT
121 ATGGGAAATA CTGAATATCA TTATGTGAGT TTGGATAGAG TGGATCATGT TAAGATGCCT
181 GAAGAGCCIG TAGGTTATGG TGGAGATACT TIACCTATTG TTCCTACTAC AGCTGCIAGT
241 GTATCTGGTA GTGATGCAGG CGTTGCTGTA GGTAATGTTA AAGATTTTGA AGATAATGTT
301 TTTTCATATA CATCTACTAT AAGAAACGAT GAATTGAAGA TAGATTACG AATACATACT
361 TTAAAGGATT TATCTGATAA AAGATTACGT GAAATTGAAA AGGGATTTAA TGATACGGTA
421 ACAAATTTA AAAATAATTT TGGGTTAGAA CCAAATGATG GAGAACTAT TTTTGATTTA

ES 2 913 324 T3

481 TACCTTTTTG ATGATAAGGA ACAATATAAT TATTATGGAA AGCTTTATAA CTTAGGAATT
541 AGTGGATCTG GAGGTATGAC TTTCTATGGA AATGCTAATG TTCCATATAA AATTTATGTA
601 CATCAATATG GTGAAATATT GAATTTAAAA CATGAATTAA CTCATGCATT AGAAAGTTAT
661 GCATCTGGAC ATAAATTGCA TGGTTCGAC GTAAATAGCA GAATATTTAC GGAAGGATTA
721 GCTGATTATA TCCAAGAAGA TAATAGTTTT ATTATGAGAG GATTAAAGGA TCGAGAGATC
781 ACTTCAGATG TATTGAAAGA TTCTTCTGGT AATGTAGATC ATTTAAGTGG TGTTGCAGTG
841 AATGAAAATC AGAGGTAAAG TTATAGTATA GGACATGCAT TTGTAAGCTT TTTACAAGAG
901 AAATATCCTA AGTTAATTTT GGAATATTTA AACGCATTAA AAGAGGATAA TATTATTCGT
961 GCTAAAGAAA TAATTAGTAT GGATAAGTAT CCAGATTTTG AGCCGTGGGT GAAGTCTAAA
1021 GACATTAGTT TATATTTAGA AAATATGAAT GTATTAAGT TAGGATTAGG TGAGAAAAATG
1081 TTTTCTGCTG AAAGTGCTAG CTATTTTGAA GATCAAGGTG TCAATAAAGA ATATTACCAT
1141 GAAAAATATTT ATGATATGAG TGGTAAACTA GTAGGTGAAA TGTCACCTGT AGTGCATTAT
1201 GCACAAAAAA ATGTGATTCG TATTTGGAAT ATTGCAAGTC CTGATATGAT AGAGGTGCGA
1261 CCAGAATATA ACTTTCTGAA ATTGGTAACT ACTCCATCTG GTAAGTCTGC ATATGTATAT
1321 TGTGATAAGA ATGGGCATGA GTATTTAAT ACTAAAGATT ACATAGATTC TCGTTTTAAT
1381 ATATTGGCAA GATATGATGT TAAGCTTCGT GAAAGTAGTG ATGCTTTGGA TATTAGAGGT
1441 CGTTACTCAG ATGCTGCTAA AGTGTTAGT AAGCTGCCTA ATGCGGATTT GCTGTTGGAT
1501 AAGTTTTTAG AAAAAATAGG TTATAGTAGT TATAAGCAGA TAATAATGAG TAATCCAGAA
1561 CAGCTTAATT CTATTAAGGC TTATGTAGTA AAAGAAGTGT TTGAAAAATT TAGGGAATCT
1621 GAGGTCAAAA AGGTGTTGAG TGGTGAGTCT CATCCGGAAG TAAGAAATGT ATTAATGGAT
1681 CTTACCTATG TTGATTTAAA GAGTGTATA GGAGTAAATG GTGCAGATAT TGACAGTATT
1741 ATTTCTAATC CAGATGTAAT GTTGCCTACT GCTGTGTTAG GTAAAGGAAA TGCAAGTGGG
1801 ATATCTCTAT ATGTAGATGA TCAGAAAGTT GGTGAGCTGT CAACGAAGC AGGTTATTGT
1861 GTTAAAAATC TTGATACTGG TAAAGTGAT TTTATGTTCC ATAATGTTGT TGGAATGATA
1921 GCAAGTGGTT ATGAAGACAG AGCATATATG GTTGTATTAG AAAAAGATGG TAAGTTTACT
1981 ACTGCTCTAG TTAATAATAT AAAAAAGCA GCAGATGGAA ATGTTGTATG GGATAATCAA
2041 TTTAATCATC CGAATATTAA TAACTGCAC TCAAATTATA AGGAGCTGTT GTTAAATGAT
2101 GCTTCAGTTA AAGATTACTC TCATCTGCG GATGTGAAAT TTAATAAAGA TGATACAGTA
2161 ATGTGTTAAG GTGAATTATT AGATGATAAA GGTACTGTAA GTGTAGATGA TGATGTACAT
2221 CGTGCAGTTG TTAAGCATGA TGATCAAATA CTACATCAGT TTAAGAGTAT GTCTTTTTAC
2281 ATTACTIONC CATCAGCTGA TTCAGGTGAC AATTATGGAA GTGATTTTTT CATTCTGAT
2341 GAAGGAAAAA ATCTTAGATT TCAACTCCT AAAGCTATTA CGCATTTGAA ATTGGTTAAT
2401 GTTAATGGAA ATAATAAGTT GGTACCATGT ACTAAAGATG GGAATGAACA TCCTGAAGGT
2461 ATGCCAICTG ATTTAACGGA TGAATATAGA TATATAGATC CTATTTTTGC TCATACATTT
2521 GAGAAACAAA GTTATTCTAA AAATAGTATT AGTGTGGGT TAGTGGACTT CAGTAAATAT
2581 AAAGAAGGAT CTATGTTTAA ATTACAGCAT TATCTGATG ATTATCATAT TCATAAGGAT
2641 GAACAAGGTA ATGTTATTAG GCCTAATAAC AGATCTTACG TTACAAAAGT GGATTTAGTA
2701 TATGATGATA AAGTTATTGG GATGTTGCT GATAGTATAA ATCAATTTCA GGGTGATATT
2761 TTCATTTCTG CAAGCCTTAA TTATAGCCAC AATGATTTTC TTTTATCTAA GTACTTTCAG
2821 AAAGTTAATA TTGAGGCGTT AGAAAATGGA ATATATAGTG GAAGATATGA TGTAGGAGAT
2881 GGTGACCAAA TAGCAGGTCT TAATACTGAT ACAGGTTATA GTGATAAAGC TATTTTTTAC
2941 TTTAAAAATG ATAGCGCATC TACTGATATG CCGCTAGTG ATGTTACTAC TATTTTACCT
3001 TATATAAATG AGCTTTAA

SEQ ID NO:12 Secuencia de proteína de proteína ribosomal L1
ORIGEN

ES 2 913 324 T3

1 MTIFLESDDD KSNFKKTLEN GTKDKTNLDN TYYDYHHEDD MGNTEYHYVS LDRVHVHKMP
61 EEPVGYGGDT LPIVPTTAAS VSGSDAGVAV GNVKDFEDNV FHHTSTIRND ELKIDLRIHT
121 LKDLSDKRLR EIEKGFNDTV TKFKNNFGL E PNDGETIFDL YLFDDKEQYN YYGKLYNLGI
181 SGSGGMIFYG NANVPYKIYV HQYGEILNLK HELTHALESY ASGHKLHGSD VNSRIFTEGL
241 ADYIQEDNSF IMRGLKDREI TSDVLKSSG NVDHLSGVAV NENQRLSYSI GHAFVSFLQE
301 KYPKLISEYL NALKEDNIIR AKEIISMDKY PDFEPWVSK DISLYLENMN VLKLGGLGKEM
361 FSAESASYFE DQGVNKEYYH ENIYDMSGKL VGEMSPVVHY AQKNVIRIWN IASPDMEIEVR
421 PEYNFLKLV TSPGKSAYVY CDKNGHEYFN TKDYIDSAFN ILARYDVKLR ESSDALDIRG
481 RYSDAAKVFS KLPNADLLLD KPLEKIGYSS YKQIIMSNE QLNSIKAYVV KEVFENFRES
541 EVKVLVSGES HPEVRNVLMD LTYVDLKSVI GVNADIDSI ISNPDVMLRT AVLKGNASG
601 ISLYVDDQKV GELSTEAGYC VKNLDTGKVI FMFHNVVGMI ASGYEDRAYM VVLEKDGKFT
661 TALVNNIQKA ADGNVVDNQ FNHPNINNLH SNYKELLND ASVKDYSHLA DVKFNKDDTV
721 IVKGELDDK GTVSDDDVH RAVVKHDDQI LHQFKSMSFY ITEPSADSGD NYGSDFFISD
781 EGKNLRFQLP KAITHLKLVN VNGNKLVPK TKGNEHPEG MPSDLTDEYR YIDPIFAHTF
841 EKQSYSKNSI SVGLVDFSKY KEGSMFKLQH YSDDYHIHKD EQGNVIRPNN RSYVTKVDLV
901 YDDKVIQMLS DSINQFQDI FISASLNYSH NDFLSSKYFQ KVNIEALENG IYSGRYDVGD
961 GDQIAGLNTD TGYSKAIIFY FKNDASTDM PASDVTTILP YINEL.

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

1 ATGGATAGTA TAAGTGCAA TCACATACGC AATATTTTAT TCCTTGTTTT AGGCGCATT
61 TTTGGACTGG AATTTTGCTT TTATTTATCA GGTGTATTAT TCATCTTAAT GGTCTGGGA
121 CCAAATTACC TAGATTTTAA TGCTATAAAT CCCAGTTTGA GTGATTTTCC AGACAGAATT
181 TGGCCAAC TA TTTTACTA TGTACAACAT TGGTGAAGA ACCCTTCTGC ATACGATGCA
241 GTTTTATTAC TTAAGCTAAT AACGTCATTA TGTACACCAG TAGGTATTCT AAGCATAGTA
301 TTATGGAACC TTAGAAATAT ATTATTGAT TGGAGGCCAT TTAAGAAGAA AGAATCACTG
361 CATGGAGATT CAAGATGGGC AACAGAAAAA GATATTCGCA AAATAGGATT ACGTAGTAGA
421 AAAGGAATAT TATTAGGAA AGACAAGAGA GGATATCTCA TTGCAGATGG ATATCAACAT
481 GCATTGTTAT TTGCACCAAC TGGATCCGGA AAAGGTGTAG GTTTTGTAAT ACCAAACTA
541 TTATTCTGGG AAGATTCTGT AGTAGTACAC GATATAAAT TAGAGAACTA TGATCTTACA
601 AGTGGGTGGA GAAAAAAG GGGACAAGAA GTTTTCGTGT GGAACCCAGC ACAACCTGAC
661 GGTATAAGTC ACTGTTACAA CCCATTAGAT TGGATAAGCT CTAAGCCTGG ACAAATGGTA
721 GATGATGTAC AAAAAATTGC CAATCTAATA ATGCCTGAAC AAGATTTTTG GTATAACGAA
781 GCACGTAGTT TATTTGTAGG AGTAGTATTA TACTTACTAG CAGTACCAGA AAAAGTAAAA
841 TCCTTTGGAG AAGTTGTAAG AACAATGCGC AGCGATGACG TAGTCTACAA CTTAGCAGTA
901 GTACTAGACA CAATAGGGAA AAAGATTCAC CCAGTTGCAT ACATGAATAT AGCTGCATT
961 TTACAAAAAG CAGACAAAGA ACGCTCAGG GTTGTATCAA CTATGAATC ATCTTTAGAA
1021 TTATGGCAA ACCCATTAAT AGATACAGCA ACAGCATCAA GTGATTTTAA TATTCAAGAA

ES 2 913 324 T3

1081 TTTAAAAGGA AAAAAGTAAC AGTATATGTT GGATTAACAC CAGATAATTT AACTCGTCTT
1141 AGACCTTTAA TGCAGGTATT TTATCAACAA GCTACAGAAT TTTTATGTAG AACTTTACCA
1201 TCAGATGATG AACCATATGG TGTACTGTTC TTAATGGATG AGTTTCCAAC ATTAGGAAAA
1261 ATGGAGCAAT TTCAAACAGG TATCGCATAT TTCCGIGGAT ATAGAGTTAG ACTATTTTIG
1321 ATTATTCAAG ATACTGAACA GCTTAAGGGT ATATATGAAG AAGCAGGAAT GAACTCATTC
1381 TTATCAAACCT CTACTIONTATAG AATAACTTTT GCTGCAAATA ATATAGAAAC TGCAAATTTA
1441 ATATCACAGT TAATAGGAAA TAAAACCTGTT AACCAAGAGT CTTTAAACAG ACCTAAATTT
1501 TTAGATTTGA ACCCTGCATC ACGTTCATTA CATATATCAG AAACACAAAG AGCTTTACTA
1561 TTACCTCAAG AAGTAATAAT GTTACCCAGA GATGAGCAAA TACTTTTTAAT AGAATCTACT
1621 TATCCTATAA AATCAAAGAA AATAAAATAC TATGAAGACA AAAATTTTAC AAAAAAATA
1681 TTAAAGAGTA CCTTTGTTCC AACTCAAGAG CCTTATGATC CCAACAAAAC AAAAACAGCA
1741 ACAAAGAAA ACGAAGAACC TATGCCAAGT ATTGAAAGCG ATCTTCCTAA AAATACATCT
1801 GACAATACTG AAAACAATAT GGAAGATGGT GCAATGTACA GCAGCATAGA AGAAGATTAT
1861 GACGATGATG ATGATGATTT TAATTTTGAA GACTTAGATG AATATATGGA TGAAGAAGAA
1921 GATTATGATG ATGAAGAATA TGATGATATA GATTATGATG ATAATAACAA TAGTAATGAG
1981 GAGTATGAAG AAGATAATCC AGAAGAAGAT GACAATAGCA ATAATCTAGA CGATGAGGAA
2041 GAGGAAGAAG ATAATATTAT AGATTATGAA GATGAAGAAG AATATGATGA TAACATAGAC
2101 TACAAAGATG ATGACAATAA CTACAACAAA GATACCACTG ACGATCAAGA CTCAAAAAAA
2161 CATAATGAAT AG

SEQ ID NO:14 Secuencia de proteínas secretoras VirD4 de tipo IV ORIGEN

1 MDSISANHIR NILFLVLGAF FGLEFCFYLS GVLFILMVWG PNYLDFNAIN PLSDFPDRI
61 WPTIFDYVQH WWKNPSAYDA VLLLKLITSL CTPVGILSIV LWNLRNIFD WRPFKKKESL
121 HGDSRWATEK DIRKIGLRSR KGILLGKDKR GYLIADGYQH ALLFAPTGS GKVGFVIPNL
181 LFWEDSVVH DIKLENYDLT SGWRKKRQGE VFWNPAQPD GISHCYNPLD WISSKPGQMV
241 DDVQKIANLI MPEQDFWYNE ARSLFVGVVL YLLAVPEKVK SFGEVVRTMR SDDVVYNLAV
301 VLDTIGKKIH PVAYMNIAAF LQKADKERSG VVSTMNSSLE LWANPLIDTA TASSDFNIQE
361 FKRKKVTYVYV GLTPDNLTRL RPLMQVFYQQ ATEFLCRTLP SDDEPYGVLF LMDEFPTLTK
421 MEQFQTGIAY FRGYRVRLF I IQDTEQLKG IYEEAGMNSF LSNSTYRITF AANNIETANL
481 ISQLIGNKTV NQESLNRPKF LDLNPASRSL HISETQRALL LPQEVIMLPR DEQILLIEST
541 YPIKSKKIKY YEDKNFTKKL LKSTFVPTQE PYDPNKTKTA TKENEEPMPS IESDLPKNTS
601 DNTENMEDG AMYSSIEEDY DDDDDDFNFE DLDEYMDEEE DYDDEEYDDI DYDDNNNSNE
661 EYEEDNPEED DNSNNLDDEE EEDDNIIDYE DEEYDDNID YKDDNNYK DTTDDQDSK
721 HNE.

SEQ ID NO:15

MDIDNNVTTSSSTQDKSGNLMEVIMRILNFGNNSD
EKVSNEDTKVLVESLQPAVNDNVGNPSSSEVGKEEN
APEVKAEDLQPAVDGSEHSSSEVGKVKVSETSKEE
STPEVKAEDLQPAVDGSEHSSSEVGKVKVSETSKEE

ES 2 913 324 T3

5 ESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSETSK
EENTPEVKAEDLQPAVDGSIEHSSSEVGEKVSKTS
KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSET
SKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSK
TSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVS
ETSKEENTPEVRAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKV
10 SETSKEESTPEVKAEDLQPAVDSSIEHSSSEVGKK
VSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGE
KVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEV
15 EKVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEV
GEKVSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSE
VGEKVSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSS
20 EVGEKVSETSKEESTPEVKAEVQPVADGNPVPLNP
MPSIDNIDTNIIFHYHKDCKKGSAVGTDEMCCPVS
ELMAGEHVHMYGIYVYRVQSVKDLSGVFNIDHSTC
25 DCNLDVYFVGYNSFTNKETVDLI

SEQ ID NO:16

30 KEENAPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGKVSETS
KEESTPEVKAEDLQPAVDGSIEHSSSEVGEKVSKTS
KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSETS
KEENTPEVKAEDLQPAVDGSIEHSSSEVGEKVSKTS
35 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSETS
KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSKTS
KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSETS
40 KEENTPEVRAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
KEESTPEVKAEDLQPAVDSSIEHSSSEVGKVSETS
KEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
45 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVEHSSSEVGEKVSETS
50 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
KEESTPEVKA

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

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

60 SEQ ID NO:20 *E. canis*
CKEESTPEVKAEDLQPAVDSVEHSSSEVGVKVSSETS

SEQ ID NO:21
XPEVKAEDLQPAVDGSVEHX, en donde X = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos.

65 SEQ ID NO:22
CMLHVQNHVDQHTNHIHDDYHFTGPT

ES 2 913 324 T3

SEQ ID NO:23
CTNHIEHDDYHFTGPTSFEVNLSEEEKMEL

5 SEQ ID NO:24
CTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVSSIDS

SEQ ID NO:25

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

SEQ ID NO:26

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

SEQ ID NO:27

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

SEQ ID NO:28

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

SEQ ID NO:29

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

SEQ ID NO:30

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

SEQ ID NO:31

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

SEQ ID NO:32

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

50 SEQ ID NO:33

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

Los siguientes polipéptidos también se describen en la presente descripción:

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

- (e) Aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 1 es C o ausente, y en donde X en la posición 25 es D o G;
- (f) Aminoácidos 13-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- 5 (g) Aminoácidos 24-49 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (h) Aminoácidos 13-27 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- 10 (i) Aminoácidos 24-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (j) Aminoácidos 13-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- (k) Aminoácidos 24-49 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino;
- 15 (l) Aminoácidos 24-41 de la SEQ ID NO:33, en donde la X en la posición 25 es D o G, X en la posición 36 es E o G, y una C está opcionalmente presente en el extremo amino.

Listado de secuencias

- 20 <110> Krah, Eugene R O'Connor, Thomas P. Beall, Melissa J Chandrashekar, Ramaswamy
- <120> DIVA de Ehrlichia canis (que diferencia animales infectados de vacunados)
- <130> 04-947-D-WO
- 25 <140> PCT/US08/82038
- <141> 2008-10-31
- <150> 60/984019
- 30 <151> 2007-10-31
- <160> 33
- <170> PatentIn versión 3.3
- 35 <210> 1
- <211> 2067
- <212> ADN
- <213> Ehrlichia canis
- 40 <400> 1

ES 2 913 324 T3

	atggatattg	ataacaataa	tgtgactaca	tcaagtacgc	aagataaaaag	tgggaattta	60
	atggaagtga	ttatgcgtat	attaaatttt	ggtaataatt	cagatgagaa	agtaagcaat	120
5	gaagacacta	aagttcttgt	agagagttta	caacctgctg	tgaatgacaa	tgtaggaaat	180
	ccatcaagtg	aagttggtaa	agaagaaaat	gctcctgaag	ttaaagcggg	agatttgcaa	240
10	cctgctgtag	atggtagtgt	agaacattca	tcaagtgaag	ttgggaaaaa	agtatctgaa	300
	actagtaaag	aggaaagtac	tcctgaagtt	aaagcagaag	atttgcaacc	tgctgtagat	360
	ggtagtatag	aacattcatc	aagtgaagtt	ggagaaaaag	tatctaaaac	tagtaaagag	420
15	gaaagtactc	ctgaagttaa	agcagaagat	ttgcaacctg	ctgtagatga	tagtgtggaa	480
	cattcatcaa	gtgaagttgg	agaaaaagta	tctgaaacta	gtaaagagga	aaatactcct	540
20	gaagttaaag	cagaagattt	gcaacctgct	gtagatggta	gtatagaaca	ttcatcaagt	600
	gaagttggag	aaaaagtatc	taaaactagt	aaagaggaaa	gtactcctga	agttaaagca	660
	gaagatttgc	aacctgctgt	agatgatagt	gtggaacatt	catcaagtga	agttggagaa	720
25	aaagtatctg	aaactagtaa	agaggaaaat	actcctgaag	ttaaagcaga	agatttgcaa	780
	cctgctgtag	atggtagtgt	ggaacattca	tcaagtgaag	ttggagaaaa	agtatctaaa	840
30	actagtaaag	aggaaagtac	tcctgaagtt	aaagcagaag	atttgcaacc	tgctgtagat	900
	gatagtgtgg	aacattcatc	aagtgaagtt	ggagaaaaag	tatctgaaac	tagtaaagag	960
35	gaaaatactc	ctgaagttag	agcagaagat	ttgcaacctg	ctgtagatgg	tagttagaaa	1020

ES 2 913 324 T3

cattcatcaa gtgaagttgg agaaaaagta tctgaaacta gtaaagagga aagtactcct 1080
 gaagttaaag cagaagattt gcaacctgct gtagatagta gtatagaaca ttcacatcaagt 1140
 5 gaagttggga aaaaagtatc tgaaactagt aaagaggaaa gtactcctga agttaaagca 1200
 gaagatttgc aacctgctgt agatggtagt gtagaacatt catcaagtga agttggagaa 1260
 10 aaagtatctg aaactagtaa agaggaaaat actcctgaag ttaaagcaga agatttgcaa 1320
 cctgctgtag atggtagtgt agaacattca tcaagtgaag ttggagaaaa agtatctgaa 1380
 actagtaaag aggaaaatac tcctgaagtt aaagcggaag atttgcaacc tgctgtagat 1440
 15 ggtagtgtag aacattcatc aagtgaagtt ggagaaaaag tatctgaaac tagtaaagaa 1500
 gaaagtactc ctgaagttaa agcagaagat ttgcaacctg ctgtagatga tagttagtaa 1560
 20 cattcatcaa gtgaagttgg agaaaaagta tctgaaacta gtaaagaaga aagtactcct 1620
 gaagttaaag cggaagattt gcaacctgct gtagatggta gtgtggaaca ttcacatcaagt 1680
 25 gaagttggag aaaaagtatc tgagactagt aaagaggaaa gtactcctga agttaaagcg 1740
 gaagtacagc ctggttcaga tggtaatcct gttcctttaa atcctatgcc ttcaattgat 1800
 aatattgata ctaatataat attccattac cataaagact gtaaaaaagg ttcagctgta 1860
 30 ggaacagatg aatgtgttg tcctgtatca gaattaatgg ctggggaaca tgttcatatg 1920
 tatggaattt atgtctatag agttcaatca gtaaaggatt taagtgggtg atttaataa 1980
 35 gatcattcta catgtgattg taatttagat gtttattttg taggatacaa ttcttttact 2040
 aacaaagaaa cagttgattt aatataa 2067

<210> 2
 <211> 688
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 2
 45 Met Asp Ile Asp Asn Asn Asn Val Thr Thr Ser Ser Thr Gln Asp Lys
 1 5 10 15
 50 Ser Gly Asn Leu Met Glu Val Ile Met Arg Ile Leu Asn Phe Gly Asn
 20 25 30
 55 Asn Ser Asp Glu Lys Val Ser Asn Glu Asp Thr Lys Val Leu Val Glu
 35 40 45
 60 Ser Leu Gln Pro Ala Val Asn Asp Asn Val Gly Asn Pro Ser Ser Glu
 50 55 60
 65 Val Gly Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 65 70 75 80

ES 2 913 324 T3

Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys
 85 90 95
 5 Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala
 100 105 110
 10 Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser
 115 120 125
 15 Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
 130 135 140
 20 Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu
 145 150 155 160
 25 His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu
 165 170 175
 30 Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp
 180 185 190
 35 Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys
 195 200 205
 40 Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 210 215 220
 45 Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu
 225 230 235 240
 50 Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala
 245 250 255
 55 Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser
 260 265 270
 60 Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Thr Ser Lys Glu
 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320
 65 Glu Asn Thr Pro Glu Val Arg Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp

ES 2 913 324 T3

					325						330					335
5	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu
				340					345					350		
10	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln
			355					360					365			
15	Pro	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Lys
		370					375					380				
20	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala
	385					390					395					400
25	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser
					405					410					415	
30	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	Thr	Pro
			420						425					430		
35	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu
			435					440					445			
40	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu
	450						455					460				
45	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp
	465					470					475					480
50	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu
					485					490					495	
55	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln
			500						505					510		
60	Pro	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu
			515					520					525			
65	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala
	530						535					540				
70	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser
	545					550					555					560
75	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro
					565					570					575	

ES 2 913 324 T3

Glu Val Lys Ala Glu Val Gln Pro Val Ala Asp Gly Asn Pro Val Pro
 580 585 590
 5 Leu Asn Pro Met Pro Ser Ile Asp Asn Ile Asp Thr Asn Ile Ile Phe
 595 600 605
 10 His Tyr His Lys Asp Cys Lys Lys Gly Ser Ala Val Gly Thr Asp Glu
 610 615 620
 15 Met Cys Cys Pro Val Ser Glu Leu Met Ala Gly Glu His Val His Met
 625 630 635 640
 20 Tyr Gly Ile Tyr Val Tyr Arg Val Gln Ser Val Lys Asp Leu Ser Gly
 645 650 655
 25 Val Phe Asn Ile Asp His Ser Thr Cys Asp Cys Asn Leu Asp Val Tyr
 660 665 670
 30 Phe Val Gly Tyr Asn Ser Phe Thr Asn Lys Glu Thr Val Asp Leu Ile
 675 680 685

<210> 3
 <211> 3186
 <212> ADN
 <213> Ehrlichia canis

<400> 3

aatttagatt ttggacttgt agatggagat ggtaaaaatc ctttacatca tgctgttgaa 60
 catttgccac ctgttatact taagggcgta atggaccatg taaaaaatag tagtgagttt 120
 40 caagatttag taaatgatcc tgattathtt ggaaatacta tagctcatta tgcagttaag 180
 aataaaaatg ctgatttaac attgtttaac atgctgaaag cttcaggagc tgatttaaat 240
 45 gttaggaatg tagttggtcg agctccaata catgttgctt cttctaattg taaggctaatt 300
 gcagtttctg gacttgatc atgtggtatt gacgttaatt ctcaagatgt gaatggagat 360
 acaccacttc atattgctgt tgaaggcggg agtatggaga cggatttagc agtgttaaat 420
 50 cagagaggtg ctgatgtag tgtccagaat aacgatggag ttacacctat gcttagtgct 480
 gctaaatatg gagatatagg tgtaataaaa gctttagggt cagctaaacc aatattaaa 540
 55 ggtgaagaca ctgttgctaa atcattgctg atggaggatt acaaaggttt tacacccttg 600
 cttttgtag ctggtggtg tagcagagat acattccgtg tcgtaagaaa aaattatgaa 660
 aaatgtcatg acttagctac tattagggca gctttaatgc aagatagaag tgggtggtgag 720
 60 cttgtaaatt taggggattt tgaaagtgaa aatatattgg gttcgccaaa tgcaaaattc 780
 ttgcagcata ttcaatcagc aaattttggt ttttctccag cgcattgtgc tatagtatcg 840
 65 tctaatacaca atgtaatgaa agatatctta aattttggtg gggattcgtt acacctacca 900

ES 2 913 324 T3

agtgagcgtg ggtataatgc aatgcaggtt gctgctttgt ttggtgacaa agaagcagtg 960
 aaaatgcttg ctaaaagtgc taagccaagt gatcttaatt ttaagacttc agcaactcct 1020
 5 actccgtaa atcttgcagtg tcttagaggt gataatgagg tagtacgtgg gttagtaggt 1080
 caacatggta ttgacattaa ccaacgtatg ggaagtgata aaaacactgt attgcattat 1140
 10 gcaatcagca aaggagatag ttttcttgtg caaaagatat tagctcatac tggagttgat 1200
 gttaattgtg agaataacct aggtcaaacg cctttacatt tagcagttga gggaggagat 1260
 cctaagatag tatcttctct tcttaaagct ggtgcagtag ttaatcgtct ggatgataat 1320
 15 ggtagatctg tactttcttc tgcgatagtt ccaggtagaa aagaaaaggg agtgctgggt 1380
 atagttaata aattgctgga tagaggtgca gatattaatt tagatggaga ccacaatata 1440
 20 ctttttgatc agtgtctaag gggtgatagat aataatgtat tagataagtt aatacaacia 1500
 ggggttgaag ttaatcgaaa tagtgaataa cgtccaatgg tttatgctgc aatatctggt 1560
 aatgagcatg ctatcaaac attagctaatt gctggaggag atgttaatga agtagtaaat 1620
 25 aatccatcta gtaggcattc aggaaatcct ttaattatgg ttgcagtagc agatggtaat 1680
 gcaggtcttc ttaaaacatt agtttctgaa ggatgtgatg ttggtaaatac tggaaaagat 1740
 30 ggtaatacag cgttacatta tgctgttagt cattcagata aagagtttgg taataaagct 1800
 ataaagatat taatttcacg taatagtgtt gggactaata gagatattct tactcaaaag 1860
 aataacgcag gtgatacacc tttacatgaa gctcttaagt caggtaatat taattctgta 1920
 35 cagaatatct taagtgtgtg acatccaaga tacgcaaagg agatattaac agccagagac 1980
 aaagaagggg acacaccaat gcattatact gttggagtaa ataatgttga tgttggtaga 2040
 40 agtattctag agtctatgct ctctaaaggt gtgaataatc ttggagagat tgttgagca 2100
 caggatagta attttcgaac acctctgcat gctgctatta aaatatctga ttatcgtgct 2160
 45 gcggacatga taataggtag cttatcgaaa acagaattgt caaagttatc gcaattaaca 2220
 gatattaacg gggatacacc actacatctt tcttgtcagt ctggtaaatg cgagatgaca 2280
 caattctttc ttggaggttt ggataaacgt gaattacct aagacattaa gatagcaaat 2340
 50 aaaaatggag atactccttt acatgatgct ataagaaatg atgatattaa atctgcaaaa 2400
 atgatgatta ggaattgtaa caaagaagaa cttgctaatag tattaataatg taaagatagt 2460
 55 tttggtaata cagtattgca tactattgct gaccaagtta ttgcgaatcc agaatcaaag 2520
 aaagaccttg atggtttgat gaatttagca gtgaaaaggg taaagaatca agatctgaaa 2580
 gatctagtta atacgcgaaa taactctgac gatactgttg cacattgtgc tcttttatcg 2640
 60 gatatgaaat atgctcaaaa gatacttaaa tcatgtaacc atgatacatt agtgagagga 2700
 aatagtaata atcaatcttt atcagagtgt attcgtgatg atagtaata taaaaaggt 2760

ES 2 913 324 T3

ggaattttta gtaagtcttt attttcaaaa ttaaagaaac ttgaggcacg agctgccagc 2820
 gctagttatg aagaattatc tagtatcagt agtggttagtg atgtttcttc tgtatcaaca 2880
 5 aatagcacag aagtaagtgc agtacctgaa gtggcaagaa gtagtggtgc tgtgtcgttc 2940
 aaacatgtgc aagaaacagg agttgacacg tctggtcctt ctgatataga aagtttagag 3000
 10 agattatctg atactagtct tgggtcaaat gattttgatc agcgaatggc agatttagat 3060
 caagaaatag caaatattgt tagtggttta ccagaagtta cccaggtagc tgtaagtcaa 3120
 caacaagcag catctcctag ttcagggtcaa gctgctggtg tgcaacaaaa agagatgcag 3180
 15 agataa 3186
 <210> 4
 <211> 1061
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis
 <400> 4
 25 Asn Leu Asp Phe Gly Leu Val Asp Gly Asp Gly Lys Asn Pro Leu His
 1 5 10 15
 30 His Ala Val Glu His Leu Pro Pro Val Ile Leu Lys Gly Val Met Asp
 20 25 30
 35 His Val Lys Asn Ser Ser Glu Phe Gln Asp Leu Val Asn Asp Pro Asp
 35 40 45
 40 Tyr Phe Gly Asn Thr Ile Ala His Tyr Ala Val Lys Asn Lys Asn Ala
 50 55 60
 45 Asp Leu Thr Leu Phe Asn Met Leu Lys Ala Ser Gly Ala Asp Leu Asn
 65 70 75 80
 50 Val Arg Asn Val Val Gly Arg Ala Pro Ile His Val Ala Ser Ser Asn
 85 90 95
 55 Gly Lys Ala Asn Ala Val Ser Gly Leu Val Ser Cys Gly Ile Asp Val
 100 105 110
 60 Asn Ser Gln Asp Val Asn Gly Asp Thr Pro Leu His Ile Ala Val Glu
 115 120 125
 65 Gly Gly Ser Met Glu Thr Val Leu Ala Val Leu Asn Gln Arg Gly Ala
 130 135 140
 Asp Val Ser Val Gln Asn Asn Asp Gly Val Thr Pro Met Leu Ser Ala
 145 150 155 160

ES 2 913 324 T3

	Ala	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gly	Ser	Ala	Lys
					165					170					175	
5	Pro	Asn	Ile	Lys	Gly	Glu	Asp	Thr	Val	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Met	Glu
				180					185					190		
10	Asp	Tyr	Lys	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	His	Phe	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser
			195					200					205			
15	Arg	Asp	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Arg	Lys	Asn	Tyr	Glu	Lys	Cys	His	Asp
		210					215					220				
20	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	Ala	Ala	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Ser	Gly	Gly	Glu
	225					230					235					240
25	Leu	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Phe	Glu	Ser	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Ser	Pro
				245						250					255	
30	Asn	Ala	Lys	Phe	Leu	Gln	His	Ile	Gln	Ser	Ala	Asn	Phe	Gly	Phe	Ser
			260						265					270		
35	Pro	Ala	His	Cys	Ala	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	His	Asn	Val	Met	Lys	Asp
			275					280					285			
40	Ile	Leu	Asn	Phe	Val	Gly	Asp	Ser	Leu	His	Leu	Pro	Ser	Glu	Arg	Gly
	290					295						300				
45	Tyr	Asn	Ala	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Glu	Ala	Val
	305					310					315					320
50	Lys	Met	Leu	Ala	Lys	Ser	Ala	Lys	Pro	Ser	Asp	Leu	Asn	Phe	Lys	Thr
				325						330					335	
55	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Pro	Leu	Asn	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Gly	Asp	Asn
			340						345					350		
60	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Leu	Val	Gly	Gln	His	Gly	Ile	Asp	Ile	Asn	Gln
			355					360					365			
65	Arg	Met	Gly	Ser	Asp	Lys	Asn	Thr	Val	Leu	His	Tyr	Ala	Ile	Ser	Lys
		370					375					380				
70	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Val	Gln	Lys	Ile	Leu	Ala	His	Thr	Gly	Val	Asp
	385					390					395					400
75	Val	Asn	Cys	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Val

ES 2 913 324 T3

					405					410					415		
5	Glu	Gly	Gly	Asp	Pro	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Ala	
			420						425					430			
10	Val	Val	Asn	Arg	Leu	Asp	Asp	Asn	Gly	Arg	Ser	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	
			435					440					445				
15	Ile	Val	Pro	Gly	Arg	Lys	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Lys	
		450					455					460					
20	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Asp	Ile	Asn	Leu	Asp	Gly	Asp	His	Asn	Ile	
	465					470					475					480	
25	Leu	Phe	Asp	Gln	Cys	Leu	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asn	Asn	Val	Leu	Asp	Lys	
				485						490					495		
30	Met	Val	Tyr	Ala	Ala	Ile	Ser	Gly	Asn	Glu	His	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	
			515					520					525				
35	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Asp	Val	Asn	Glu	Val	Val	Asn	Asn	Pro	Ser	Ser	
		530					535					540					
40	Arg	His	Ser	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	
	545					550					555					560	
45	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Lys	
				565						570					575		
50	Ser	Gly	Lys	Asp	Gly	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Tyr	Ala	Val	Ser	His	Ser	
			580						585					590			
55	Asp	Lys	Glu	Phe	Gly	Asn	Lys	Ala	Ile	Lys	Ile	Leu	Ile	Ser	Arg	Asn	
			595					600					605				
60	Ser	Val	Gly	Thr	Asn	Arg	Asp	Ile	Leu	Thr	Gln	Lys	Asn	Asn	Ala	Gly	
		610					615					620					
65	Asp	Thr	Pro	Leu	His	Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	Gly	Asn	Ile	Asn	Ser	Val	
	625					630					635					640	
70	Gln	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala	Val	His	Pro	Arg	Tyr	Ala	Lys	Glu	Ile	Leu	
				645						650					655		

ES 2 913 324 T3

	Thr	Ala	Arg	Asp	Lys	Glu	Gly	Tyr	Thr	Pro	Met	His	Tyr	Thr	Val	Gly
				660					665					670		
5	Val	Asn	Asn	Val	Asp	Val	Gly	Arg	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Met	Leu	Ser
			675					680					685			
10	Lys	Gly	Val	Asn	Asn	Leu	Gly	Glu	Ile	Val	Gly	Ala	Gln	Asp	Ser	Asn
		690					695					700				
15	Phe	Arg	Thr	Pro	Leu	His	Ala	Ala	Ile	Lys	Ile	Ser	Asp	Tyr	Arg	Ala
	705					710					715					720
20	Ala	Asp	Met	Ile	Ile	Gly	Ser	Leu	Ser	Lys	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu
					725					730					735	
25	Ser	Gln	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ser	Cys
				740					745					750		
30	Gln	Ser	Gly	Asn	Val	Glu	Met	Thr	Gln	Phe	Phe	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp
			755					760					765			
35	Lys	Arg	Glu	Leu	Pro	Lys	Thr	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Lys	Asn	Gly	Asp
		770					775					780				
40	Thr	Pro	Leu	His	Asp	Ala	Ile	Arg	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Ser	Ala	Lys
	785					790					795					800
45	Met	Met	Ile	Arg	Asn	Cys	Asn	Lys	Glu	Glu	Leu	Ala	Asn	Val	Leu	Lys
					805					810					815	
50	Cys	Lys	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Thr	Val	Leu	His	Thr	Ile	Ala	Asp	Gln
				820					825					830		
55	Val	Ile	Ala	Asn	Pro	Glu	Ser	Lys	Lys	Asp	Leu	Asp	Gly	Leu	Met	Asn
			835					840					845			
60	Leu	Ala	Val	Lys	Arg	Leu	Lys	Asn	Gln	Asp	Leu	Lys	Asp	Leu	Val	Asn
		850					855					860				
65	Thr	Arg	Asn	Asn	Ser	Asp	Asp	Thr	Val	Ala	His	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
	865					870					875					880
70	Asp	Met	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Ile	Leu	Lys	Ser	Cys	Asn	His	Asp	Thr
					885					890					895	
75	Leu	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Cys	Ile	Arg
				900					905					910		

ES 2 913 324 T3

Asp Asp Ser Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Ile Phe Ser Lys Ser Leu Phe
 915 920 925

5 Ser Lys Leu Lys Lys Leu Glu Ala Arg Ala Ala Ser Ala Ser Tyr Glu
 930 935 940

10 Glu Leu Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Asp Val Ser Ser Val Ser Thr
 945 950 955 960

15 Asn Ser Thr Glu Val Ser Ala Val Pro Glu Val Ala Arg Ser Ser Gly
 965 970 975

20 Ala Val Ser Phe Lys His Val Gln Glu Thr Gly Val Asp Thr Ser Gly
 980 985 990

25 Pro Ser Asp Ile Glu Ser Leu Glu Arg Leu Ser Asp Thr Ser Leu Gly
 995 1000 1005

30 Ser Asn Asp Phe Asp Gln Arg Met Ala Asp Leu Asp Gln Glu Ile
 1010 1015 1020

35 Ala Asn Ile Val Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Gln Val Ala Val
 1025 1030 1035

40 Ser Gln Gln Gln Ala Ala Ser Pro Ser Ser Gly Gln Ala Ala Gly
 1040 1045 1050

45 Val Gln Gln Lys Glu Met Gln Arg
 1055 1060

<210> 5
 <211> 2373
 <212> ADN
 <213> Ehrlichia canis

<400> 5

50 aattatgctg aaactacttt atcatttggg gaatctcgag cagaaggacg tgaatctcca 60
 tcaagtgcac ttgttcaaac tgggtcaatca gaagtacctc ggagtgaggc tgcagagcca 120
 ttaattcaat ttcctcatga tgaagaaagt actgcattag gttctcaagc aactatgaca 180
 ggagtgtcta ctcaggctag tccgtcagca gcatatcagg atgatagtga aatatcacgt 240
 atgaggtcta tggcaggaac atctgctcaa gctgatcaat cagcagtaca tcgtcggagt 300
 60 ggtacagcat tagagccatt aattgaattg cctgatgaag aagaaaatgc tgcattagat 360
 tttcaaacag ctatgacagg agtgcctact caggctagtc cgtcagcagt acatcggagt 420

65

ES 2 913 324 T3

ggtgttgcat cagatcctac gctacctgat gatgaaagaa ttgatgttcc atcagtttca 480
 tctcaagttg taagaccttt tagtgatggt gaagattatt cagtatatga taaatcaggt 540
 5 gtagtaagtg gtcataaag acctgtttct tctagagatt caagacaatt ggatgcattt 600
 ggtgatccat cagatgattt attgccggag agtgaaatta ttgttagcag cagtaagaaa 660
 10 gcaatattag atagccaaaa tgaaatagaa tctcttattc agagtggaga tactttctaga 720
 tgtattaggg caattaatag tgctcctagt gcgtcagtgt ttcaactgaa gactttatcg 780
 aatgatatat ctattgctgg acgtgctttt ttaaattgga atattgattt aatagaagct 840
 15 tgtatgaatt ctggcaagaa attaaatcca aatattactg ataatgaaaa aaatactcta 900
 ttacatcaat ttgtaggata ttttgaacgc gatccgagaa tgttgcttga tgcaggaatg 960
 cgtaatctgt ttttgagatt atgcatggat tatggtttcg atattaatca taaaaatagt 1020
 20 aatggtaata cagtacttga tagattaaat gatttagtag aagggttaag tagttcgcaa 1080
 gttgatcttg aaagtagtgg tattgatgag tttatgatct cattgttagc tcattctaga 1140
 25 atgagtgatc aagcagtaaa gaatattgct actgocgaaa atgagttttt tgcacgtgat 1200
 tctgtttata atattagtcg tttagttgat acttctatag ttttgagaa taaattcagt 1260
 gaagtatttt atgaagtctg tggacgtatt ttatctgaag aagctggtaa acataaggggt 1320
 30 gttgctgaag caaattattc aagattgaat aaaatattaa atgatgaatg tcttagaaag 1380
 acttttagcta atacagatgc cgatggaaat aatgttttac agagattgtg tcaagatatt 1440
 35 gcttctggaa aaatcaatgc tcgtgatgac agagtattaa aactttttga gacaattata 1500
 tctaatttaa aagacaaaga taaagcatta ctagaggatt tattatttaa taatagaaac 1560
 tcaagatttg aaaattgcat tgaagctata ccacgtattc ctggtgccga tgctctattt 1620
 40 aaaaaactag aagagttatt attaaaaag aaaatagcag agtcttgtga ttttaattct 1680
 atgttagtga attgtgctga gtctgctaata gataatttat ataattacct gcgcactaat 1740
 45 tatgcagtta ttggtataaa taacgtagat ataaatggca attcatccct atgtaaagct 1800
 gttgttactg ggtcacaagg tattgttaaa gcagtattat caactggaac taatattaat 1860
 aggaaagata aaaatggtaa tacaccttta catgcattgt taatttttat gatgtctaac 1920
 50 octgaacttg tcaaggagca acatatttca cttgtgaaat tcttagcgtc tcgtggagct 1980
 ttacttaatg taaaaataa tatgaatatt tctccaatta tgcttgacaga atctattgat 2040
 55 aagaaagagg aacttgctaa gaaatttaca aatcaaaaag ttagtatttt agaactttta 2100
 atagctggta gtgaagaaca tttagggcct aaatccaaat gtatatctga gttaaagcct 2160
 tatatagaat taggaaaagg catgaagtac gaagatatac atgctgatgt aataggtggt 2220
 60 gtattatctg ctgatatgtg taatgctaga ttgcagatag gtaaattatt aaatggtgat 2280
 ttttgtaaag aaaatgaatt aaagacagta aaatttaatt tttctgatac aaataaggggt 2340
 65 tatgtacaaa atgttggtaa aaaaagaat tat 2373

ES 2 913 324 T3

<210> 6
 <211> 791
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

5

<400> 6

10	Asn	Tyr	Ala	Glu	Thr	Thr	Leu	Ser	Phe	Gly	Glu	Ser	Arg	Ala	Glu	Gly
	1				5					10					15	
15	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Phe	Val	Gln	Thr	Gly	Gln	Ser	Glu	Val
				20					25					30		
20	Pro	Arg	Ser	Glu	Ala	Ala	Glu	Pro	Leu	Ile	Gln	Phe	Pro	His	Asp	Glu
			35					40					45			
25	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly	Ser	Gln	Ala	Thr	Met	Thr	Gly	Val	Ser	Thr
		50					55					60				
30	Gln	Ala	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Tyr	Gln	Asp	Asp	Ser	Glu	Ile	Ser	Arg
	65					70					75					80
35	Met	Arg	Ser	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Ala	Gln	Ala	Asp	Gln	Ser	Ala	Val
				85						90					95	
40	His	Arg	Arg	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Glu	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	Pro	Asp
				100					105					110		
45	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Ala	Leu	Asp	Phe	Gln	Thr	Ala	Met	Thr	Gly	Val
				115				120					125			
50	Pro	Thr	Gln	Ala	Ser	Pro	Ser	Ala	Val	His	Arg	Ser	Gly	Val	Ala	Ser
		130					135					140				
55	Asp	Pro	Thr	Leu	Pro	Asp	Asp	Glu	Arg	Ile	Asp	Val	Pro	Ser	Val	Ser
	145					150					155					160
60	Ser	Gln	Val	Val	Arg	Pro	Phe	Ser	Asp	Gly	Glu	Asp	Tyr	Ser	Val	Tyr
					165					170					175	
65	Asp	Lys	Ser	Gly	Val	Val	Ser	Gly	His	Glu	Arg	Pro	Val	Ser	Ser	Arg
				180					185					190		
70	Asp	Ser	Arg	Gln	Leu	Asp	Ala	Phe	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu
			195					200					205			

ES 2 913 324 T3

	Pro	Glu	Ser	Glu	Ile	Ile	Val	Ser	Ser	Ser	Lys	Lys	Ala	Ile	Leu	Asp
	210						215					220				
5	Ser	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Ser	Leu	Ile	Gln	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Arg
	225					230					235					240
10	Cys	Ile	Arg	Ala	Ile	Asn	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Phe	Gln	Leu
					245					250					255	
15	Lys	Thr	Leu	Ser	Asn	Asp	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	Arg	Ala	Phe	Leu	Asn
				260					265					270		
20	Gly	Asn	Ile	Asp	Leu	Ile	Glu	Ala	Cys	Met	Asn	Ser	Gly	Lys	Lys	Leu
			275					280					285			
25	Asn	Pro	Asn	Ile	Thr	Asp	Asn	Glu	Lys	Asn	Thr	Leu	Leu	His	Gln	Phe
	290						295					300				
30	Val	Gly	Tyr	Phe	Glu	Arg	Asp	Pro	Arg	Met	Leu	Leu	Asp	Ala	Gly	Met
	305					310					315					320
35	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu	Arg	Leu	Cys	Met	Asp	Tyr	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn
					325					330					335	
40	His	Lys	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Val	Leu	Asp	Arg	Leu	Asn	Asp	Leu
				340					345					350		
45	Val	Glu	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Val	Asp	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Ile
			355					360					365			
50	Asp	Glu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	His	Ser	Arg	Met	Ser	Asp	Gln
	370						375					380				
55	Ala	Val	Lys	Asn	Ile	Ala	Thr	Ala	Gln	Asn	Glu	Phe	Phe	Ala	Arg	Asp
	385					390					395					400
60	Ser	Val	Tyr	Asn	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Gln
				405						410					415	
65	Asn	Lys	Phe	Ser	Glu	Val	Phe	Tyr	Glu	Val	Cys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ser
				420					425					430		
70	Glu	Glu	Ala	Gly	Lys	His	Lys	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Asn	Tyr	Ser	Arg
			435					440					445			
75	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Asp	Glu	Cys	Leu	Arg	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn
	450						455					460				

ES 2 913 324 T3

	Thr	Asp	Ala	Asp	Gly	Asn	Asn	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Gln	Asp	Ile
	465					470					475					480
5	Ala	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Asp	Arg	Val	Leu	Lys	Leu	Phe
					485					490					495	
10	Glu	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Asp	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu
				500					505					510		
15	Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Asn	Arg	Asn	Ser	Arg	Phe	Glu	Asn	Cys	Ile	Glu
			515					520					525			
20	Ala	Ile	Pro	Arg	Ile	Pro	Gly	Ala	Asp	Ala	Leu	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu
		530					535					540				
25	Glu	Leu	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Ile	Ala	Glu	Ser	Cys	Asp	Phe	Asn	Ser
	545					550					555					560
30	Met	Leu	Val	Asn	Cys	Ala	Glu	Ser	Ala	Asn	Asp	Asn	Leu	Tyr	Asn	Tyr
					565						570				575	
35	Leu	Arg	Thr	Asn	Tyr	Ala	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Val	Asp	Ile	Asn
				580					585					590		
40	Gly	Asn	Ser	Ser	Leu	Cys	Lys	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Gln	Gly	Ile
			595					600					605			
45	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Ser	Thr	Gly	Thr	Asn	Ile	Asn	Arg	Lys	Asp	Lys
		610					615					620				
50	Asn	Gly	Asn	Thr	Pro	Leu	His	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Met	Met	Ser	Asn
	625					630					635					640
55	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Glu	Gln	His	Ile	Ser	Leu	Val	Lys	Phe	Leu	Ala
					645					650					655	
60	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Asn	Val	Lys	Asn	Asn	Met	Asn	Ile	Ser	Pro
				660					665					670		
65	Ile	Met	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Asp	Lys	Lys	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Lys
			675					680					685			
70	Phe	Thr	Asn	Gln	Lys	Val	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser
		690					695					700				
75	Glu	Glu	His	Leu	Gly	Leu	Lys	Ser	Lys	Cys	Ile	Ser	Glu	Leu	Lys	Pro
	705					710					715					720

ES 2 913 324 T3

	Tyr	Ile	Glu	Leu	Gly	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	His	Ala	Asp	
					725					730					735		
5	Val	Ile	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Asp	Met	Cys	Asn	Ala	Arg	Leu	Gln	
				740					745					750			
10	Ile	Gly	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Phe	Cys	Lys	Glu	Asn	Glu	Leu	Lys	
			755					760						765			
15	Thr	Val	Lys	Phe	Asn	Phe	Ser	Asp	Thr	Asn	Lys	Gly	Tyr	Val	Gln	Asn	
		770					775					780					
20	Val	Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Tyr										
	785					790											
	<210> 7																
	<211> 2283																
	<212> ADN																
	<213> Ehrlichia canis																
25	<400> 7																
	gtaaaaaaat	taagattatt	attaaattca	ataagtgagt	taccgcaaga	attaaaagat											60
30	caaattttta	gtactagaag	tactatagat	aaattacgaa	atagaattaa	tgctgcata											120
	aagtctgacg	atagagaagg	tattgcacat	gctgtagaat	ctatggctag	ttcttattgt											180
35	gaattattag	gacattgtag	attaatTTTT	aagaaattat	atgatgaaaa	tgctgataaa											240
	agtttgctag	aattatgtat	taaagaatat	caatctgatt	taaacaaatt	attggaacaa											300
	ggtattgata	tatgtgcttc	agaagtctca	tcagaatgta	aggatttagt	ttgtaaagta											360
40	tgtgaagatg	aatttgagaa	atatgactct	ttatctaaag	tacaaagatt	cagggaatta											420
	tctggtgaaa	ttgctgattt	ggatgataaa	ttaacaagaa	gggcttcttt	tgttgagact											480
45	tttgatttat	ttagcagtag	attaagacat	tatagggaaa	ttttaggaga	tggtgattta											540
	aaatttcgag	agaggatagt	tgaaaaatat	caagaggatt	taaaggaatt	attagaatta											600
50	tctgttgatc	ttcatttggt	aataaattta	ccagcattag	aagatttacg	cgatcataga											660
	aatttagtgc	atagagcatg	taatgctgaa	attgaaaaat	atctaacttt	atgtgatgat											720
	caacaattac	gtacattatc	gcaagaagtg	aataatgctc	atggtgaatt	gatacagatg											780
55	ttttctaagt	ttagtatatt	tgttgatggc	gttactggta	ttgaacagag	cacatctcaa											840
	gtagagcacc	ctcgttctga	tattgctaaa	agagatacta	caacacccaaa	gcaacgtggt											900
60	gtgcaaggta	aagatgatat	acaatctagt	gatagtgata	gtgatagtga	tagtaaatac											960
	ggtgatgatg	atagtaaaaa	agcatcagtt	agtgcacctg	ctggtgacca	agttgtacct											1020
65	gtagctgatg	ttcaacctga	acctcagcta	ggtgaaggat	tggaaacatt	agagtctagt											1080

ES 2 913 324 T3

atagctgaag gacctgagtt gcctggtgat gcatctactg ctaagcaatc tatacctttt 1140
 gcgataacac catcaagtcc tgagacagtt gatgaaaaac ttgaaagttc tgggtgtagt 1200
 5 caagatggta ttacaacacc aggacaacgt gttgtgcaag gtaaagatga tatacaatct 1260
 agtgatagtg atagtgatag taaatacggg gatgatgata gtaaaaaagc atcagctagt 1320
 10 gcacctgctg ttgaccaagt tgtacctgta gctgatgttc aacctgaacc tcagctaggt 1380
 gaaaaattgg aacattaga gtctagtata actaaaggac ctgagttgcc tgggtgatgca 1440
 tctactgcta agcaatctat accttttgcg ataacacccat caagtcctga gacagttgat 1500
 15 gaaaaacttg aaagttctgg tgttagtcaa gatggtatta caacaccagg acaactgttt 1560
 gtgcaaggta aagatgatat acaatctagt gatagtgata gtgatagtaa atacggtgat 1620
 20 gatgatagta aaaaagcatc agctagtgca cctgctggtg accaagttgt accttctgac 1680
 actcgtgcag atggagtatc agaaccatta gcatctcatg tggatcaagg atctgatgta 1740
 25 cctggtgatg catctggtga tgggtgttgat ttaagattag gacggttata tactgagcaa 1800
 agtggattgt tgccacgtca tgaacaaaat gtaagagcat ttattttaga acagagtttg 1860
 ttagatcaat tatatatgga ctatatagat ttacaccctg atcagaaaag ttgtgaagct 1920
 30 tataattcag cattgcatgg atataataca agattagagt tacagaagga atataacagg 1980
 atttttgaat cacatgaatc agcatctcca aatgaaatta atagtttttc acaaaaaatat 2040
 35 agagcagcat taagagatgt tgccgaggat attgttaatc agggccaat gttttattct 2100
 tctagagatg caatgctatt aagggtctaga gtagacacat tgtgtgatat gtgtcgttca 2160
 40 atacgtaatc tgtatatggt tgaattagat gccatagata aagaagaaaa atcgttacia 2220
 tctgatatga aatctgcaag ttctagtgat aaaaagttga tacaagaaaa aataaaatta 2280
 ctt 2283

45 <210> 8
 <211> 761
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

50 <400> 8

Val Lys Lys Leu Arg Leu Leu Leu Asn Ser Ile Ser Glu Leu Pro Gln
 1 5 10 15

55 Glu Leu Lys Asp Gln Ile Leu Ser Thr Arg Ser Thr Ile Asp Lys Leu
 20 25 30

60 Arg Asn Arg Ile Asn Ala Cys Ile Lys Ser Asp Asp Arg Glu Gly Ile
 35 40 45

ES 2 913 324 T3

	Ala	His	Ala	Val	Glu	Ser	Met	Ala	Ser	Ser	Tyr	Cys	Glu	Leu	Leu	Gly
	50						55					60				
5	His	Cys	Arg	Leu	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Tyr	Asp	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys
	65					70					75					80
10	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Cys	Ile	Lys	Glu	Tyr	Gln	Ser	Asp	Leu	Asn	Lys
					85					90					95	
15	Leu	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	Asp	Ile	Cys	Ala	Ser	Glu	Val	Ser	Ser	Glu
				100					105					110		
20	Cys	Lys	Asp	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Cys	Glu	Asp	Glu	Phe	Glu	Lys	Tyr
			115					120					125			
25	Asp	Ser	Leu	Ser	Lys	Val	Gln	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Glu	Ile
		130					135					140				
30	Ala	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Leu	Thr	Arg	Arg	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Thr
	145					150					155					160
35	Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	His	Tyr	Arg	Glu	Ile	Leu	Gly
					165					170					175	
40	Asp	Gly	Asp	Leu	Lys	Phe	Arg	Glu	Arg	Ile	Val	Glu	Lys	Tyr	Gln	Glu
				180					185					190		
45	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ser	Val	Asp	Leu	His	Leu	Leu	Ile
			195					200					205			
50	Asn	Leu	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Val	His
		210					215					220				
55	Arg	Ala	Cys	Asn	Ala	Glu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asp	Asp
	225					230					235					240
60	Gln	Gln	Leu	Arg	Thr	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Asn	Asn	Ala	His	Gly	Glu
					245					250					255	
65	Leu	Ile	Gln	Met	Phe	Ser	Lys	Phe	Ser	Ile	Phe	Val	Asp	Gly	Val	Thr
				260					265					270		
70	Gly	Ile	Glu	Gln	Ser	Thr	Ser	Gln	Val	Glu	His	Pro	Arg	Ser	Asp	Ile
			275					280					285			
75	Ala	Lys	Arg	Asp	Thr	Thr	Thr	Pro	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Gln	Gly	Lys
	290						295					300				

ES 2 913 324 T3

	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr
	305					310					315					320
5	Gly	Asp	Asp	Asp	Ser	Lys	Lys	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Asp
					325					330					335	
10	Gln	Val	Val	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Gln	Pro	Glu	Pro	Gln	Leu	Gly	Glu
				340					345					350		
15	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Pro
			355					360					365			
20	Gly	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe	Ala	Ile	Thr	Pro
		370					375					380				
25	Ser	Ser	Pro	Glu	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Val	Ser
	385					390					395					400
30	Gln	Asp	Gly	Ile	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Gln	Gly	Lys	Asp
					405					410					415	
35	Asp	Ile	Gln	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	Asp
				420				425						430		
40	Asp	Ser	Lys	Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Asp	Gln	Val	Val
			435					440					445			
45	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Gln	Pro	Glu	Pro	Gln	Leu	Gly	Glu	Lys	Leu	Glu
		450				455						460				
50	Thr	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala
	465					470					475					480
55	Ser	Thr	Ala	Lys	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe	Ala	Ile	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro
					485					490					495	
60	Glu	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Gly
				500					505					510		
65	Ile	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Gln	Gly	Lys	Asp	Asp	Ile	Gln
			515					520					525			
70	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	Asp	Asp	Ser	Lys
		530					535					540				
75	Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Asp	Gln	Val	Val	Pro	Ser	Asp

ES 2 913 324 T3

	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Cys	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ala
	1				5					10					15	
5	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala
				20					25					30		
10	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala
			35					40					45			
15	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr
	50						55					60				
20	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly
	65					70					75					80
25	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr
					85					90					95	
30	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
				100					105					110		
35	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr
			115					120					125			
40	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr
	130						135					140				
45	Gly	Thr	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr
	145					150					155					160
50	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Thr	Cys	Gly
				165						170					175	
55	Thr	Thr	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala
			180						185					190		
60	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Thr	Ala
			195					200					205			
65	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr
			210				215					220				
70	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Ala
	225					230					235					240
75	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly
				245						250						255

ES 2 913 324 T3

Ala Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Gly
 260 265 270

5 Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 275 280 285

10 Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala
 290 295 300

15 Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Ala Gly
 305 310 315 320

20 Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr
 325 330 335

25 Thr Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Ala
 340 345 350

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Thr Gly
 355 360 365

30 Thr Thr Gly Thr Cys Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Cys Gly
 370 375 380

35 Thr Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr
 385 390 395 400

40 Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Gly Thr Ala Ala
 405 410

<210> 10
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 10

ES 2 913 324 T3

1 Met Leu His Val Gln Asn His Val Asp Gln His Thr Asn His Ile Glu
 5 His Asp Asp Tyr His Phe Thr Gly Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu
 10 Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
 15 Val Gly Cys Glu Asp Cys Asp Pro Asn Cys Arg Tyr Pro Leu Glu Leu
 20 Val Glu Cys Gln Arg Ile Glu Glu Arg Pro Val Cys Asn Ala Gly Leu
 25 Glu Ser Leu Thr Val Asp Ala Tyr Gln Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly
 30 Phe Leu Ser Ala Met Asn Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Pro Cys Tyr Tyr
 35 Tyr Asp Cys Cys Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Cys Cys His Lys Asn Ala
 Cys Tyr Tyr Asn Cys Cys Asp Cys Ala
 130 135

<210> 11
 <211> 3018
 <212> ADN
 <213> Ehrlichia canis
 <400> 11

ES 2 913 324 T3

	atgacgattt tcttagaaaag tgatgatgat aagagtaact ttaagaagac attggagaac	60
	ggtactaaag acaagacaaa tctagataat acttattatg actatcatca tgaagatgat	120
5	atgggaaata ctgaatatca ttatgtgagt ttggatagag tggatcatgt taagatgcct	180
	gaagagcctg taggttatgg tggagatact ttacctattg ttcctactac agctgctagt	240
10	gtatctggta gtgatgcagg cgttgctgta ggtaatgta aagattttga agataatgtt	300
	tttcatcata catctactat aagaaacgat gaattgaaga tagatttacg aatacactact	360
	ttaaaggatt tatctgataa aagattacgt gaaattgaaa agggatttaa tgatacggta	420
15	acaaaattta aaaataattt tgggtagaa ccaaatgatg gagaaactat ttttgattta	480
	tacctttttg atgataagga acaatataat tattatggaa agctttataa cttaggaatt	540
20	agtggatctg gaggtatgac tttctatgga aatgctaatag ttccatataa aatttatgta	600
	catcaatatg gtgaaatatt gaatttaaaa catgaattaa ctcatgcatt agaaagtat	660
25	gcatctggac ataaattgca tggttctgac gtaaatagca gaatatttac ggaaggatta	720
	gctgattata tccaagaaga taatagtttt attatgagag gattaaagga tcgagagatc	780
	acttcagatg tattgaaaga ttcttctggt aatgtagatc atttaagtgg tgttgcatg	840
30	aatgaaaatc agaggttaag ttatagtata ggacatgcat ttgtaagctt tttacaagag	900
	aaatataccta agttaatttc ggaatattta aacgcattaa aagaggataa tattattcgt	960
35	gctaaagaaa taattagtat ggataagtat ccagattttg agccgtgggt gaagtctaaa	1020
	gacattagtt tatatttaga aaatatgaat gtattaaagt taggattagg tgagaaaatg	1080

ES 2 913 324 T3

ttttctgctg aaagtgctag ctattttgaa gatcaagggtg tcaataaaga atattacat 1140
 gaaaatattt atgatatgag tggtaaacta gtaggtgaaa tgtcacctgt agtgcattat 1200
 5 gcacaaaaaa atgtgattcg tatttggaat attgcaagtc ctgatatgat agagggtcga 1260
 ccagaatata actttctgaa attggtaact actccatctg gtaagtctgc atatgtatat 1320
 10 tgtgataaga atgggcatga gtattttaat actaaagatt acatagattc tgcgtttaat 1380
 atattggcaa gatatgatgt taagcttcgt gaaagtagtg atgctttgga tattagaggt 1440
 cgttactcag atgctgctaa agtgtttagt aagctgccta atgcggattt gctgttggat 1500
 15 aagtttttag aaaaaatagg ttatagtagt tataagcaga taataatgag taatccagaa 1560
 cagcttaatt ctattaaggc ttatgtagta aaagaagtgt ttgaaaattt tagggaatct 1620
 20 gaggtcaaaa aggtggtgag tggtgagtct catccggaag taagaaatgt attaatggat 1680
 cttacctatg ttgatttaa gagtggtata ggagtaaagtg gtgcagatat tgacagtatt 1740
 atttctaate cagatgtaat gttgcgtact gctgtgtag gtaaaggaaa tgcaagtggg 1800
 25 atatctctat atgtagatga tcagaaagtt ggtgagctgt caactgaagc aggttattgt 1860
 gttaaaaate ttgatactgg taaagtgtat tttatgttcc ataatgttgt tggaatgata 1920
 30 gcaagtgggt atgaagacag agcatatatg gttgtattag aaaaagatgg taagtttact 1980
 actgctctag ttaataatat acaaaaagca gcagatggaa atgttgtatg ggataatcaa 2040
 tttaatcatc cgaatattaa taacttgca tcaaattata aggagctggt gttaatgat 2100
 35 gcttcagtta aagattactc tcacttgcg gatgtgaaat ttaataaaga tgatacagta 2160
 attgttaaag gtgaattatt agatgataaa ggtactgtaa gtgtagatga tgatgtacat 2220
 40 cgtgcagttg ttaagcatga tgatcaaata ctacatcagt ttaagagtat gtctttttac 2280
 attactgaac catcagctga ttcaggtgac aattatggaa gtgatttttt catttctgat 2340
 45 gaaggaaaa atcttagatt tcaacttcct aaagctatta cgcatttgaa attggttaat 2400
 gttaatggaa ataataagtt ggtaccatgt actaaagatg ggaatgaaca tcctgaaggt 2460
 atgccatctg atttaacgga tgaatataga tatatagatc ctatttttgc tcatacattt 2520
 50 gagaaacaaa gttattctaa aaatagtatt agtgttgggt tagtggactt cagtaaatat 2580
 aaagaaggat ctatgtttaa attacagcat tattctgatg attatcatat tcataaggat 2640
 55 gaacaaggta atgttattag gcctaataac agatcttacg ttacaaaagt ggatttagta 2700
 tatgatgata aagttattgg gatgtgtct gatagtataa atcaatttca gggatgatatt 2760
 ttcatttctg caagccttaa ttatagccac aatgattttc tttcatctaa gtactttcag 2820
 60 aaagttaata ttgaggcgtt agaaaatgga atatatagtg gaagatatga tgtaggagat 2880
 ggtgaccaa tagcaggtct taactactgat acaggttata gtgataaagc tattttttac 2940
 65

ES 2 913 324 T3

tttaaaaatg atagcgcacg tactgatatg ccggctagtg atgttactac tattttacct 3000
 tatataaatg agctttaa 3018

5 <210> 12
 <211> 1005
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

10 <400> 12

Met	Thr	Ile	Phe	Leu	Glu	Ser	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Lys	Lys
1				5					10					15	
Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Thr	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Asp	Tyr	His	His	Glu	Asp	Asp	Met	Gly	Asn	Thr	Glu	Tyr	His	Tyr
		35					40					45			
Val	Ser	Leu	Asp	Arg	Val	Asp	His	Val	Lys	Met	Pro	Glu	Glu	Pro	Val
	50					55					60				
Gly	Tyr	Gly	Gly	Asp	Thr	Leu	Pro	Ile	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser
65					70					75					80
Val	Ser	Gly	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Asn	Val	Lys	Asp	Phe
				85					90					95	
Glu	Asp	Asn	Val	Phe	His	His	Thr	Ser	Thr	Ile	Arg	Asn	Asp	Glu	Leu
			100					105					110		
Lys	Ile	Asp	Leu	Arg	Ile	His	Thr	Leu	Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Lys	Arg
		115					120					125			
Leu	Arg	Glu	Ile	Glu	Lys	Gly	Phe	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Lys	Phe	Lys
	130					135					140				
Asn	Asn	Phe	Gly	Leu	Glu	Pro	Asn	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Phe	Asp	Leu
145					150					155					160
Tyr	Leu	Phe	Asp	Asp	Lys	Glu	Gln	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Tyr
				165					170					175	
Asn	Leu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Met	Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ala
			180					185					190		
Asn	Val	Pro	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Val	His	Gln	Tyr	Gly	Glu	Ile	Leu	Asn
		195					200					205			

65

ES 2 913 324 T3

	Leu	Lys	His	Glu	Leu	Thr	His	Ala	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly	His
	210						215					220				
5	Lys	Leu	His	Gly	Ser	Asp	Val	Asn	Ser	Arg	Ile	Phe	Thr	Glu	Gly	Leu
	225					230					235					240
10	Ala	Asp	Tyr	Ile	Gln	Glu	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	Met	Arg	Gly	Leu	Lys
					245					250					255	
15	Asp	Arg	Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Val
				260					265					270		
20	Asp	His	Leu	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Asn	Glu	Asn	Gln	Arg	Leu	Ser	Tyr
			275					280					285			
25	Ser	Ile	Gly	His	Ala	Phe	Val	Ser	Phe	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Pro	Lys
	290						295					300				
30	Leu	Ile	Ser	Glu	Tyr	Leu	Asn	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Asn	Ile	Ile	Arg
	305					310					315					320
35	Ala	Lys	Glu	Ile	Ile	Ser	Met	Asp	Lys	Tyr	Pro	Asp	Phe	Glu	Pro	Trp
					325					330					335	
40	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Ile	Ser	Leu	Tyr	Leu	Glu	Asn	Met	Asn	Val	Leu
				340					345					350		
45	Lys	Leu	Gly	Leu	Gly	Glu	Lys	Met	Phe	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Ser	Tyr
			355					360					365			
50	Phe	Glu	Asp	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Tyr	Tyr	His	Glu	Asn	Ile	Tyr
	370						375					380				
55	Asp	Met	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Glu	Met	Ser	Pro	Val	Val	His	Tyr
	385					390					395					400
60	Ala	Gln	Lys	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Trp	Asn	Ile	Ala	Ser	Pro	Asp	Met
					405					410					415	
65	Ile	Glu	Val	Arg	Pro	Glu	Tyr	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Val	Thr	Thr	Pro
				420					425					430		
70	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Tyr	Val	Tyr	Cys	Asp	Lys	Asn	Gly	His	Glu	Tyr
			435					440					445			
75	Phe	Asn	Thr	Lys	Asp	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ala	Phe	Asn	Ile	Leu	Ala	Arg
	450						455					460				

ES 2 913 324 T3

Tyr Asp Val Lys Leu Arg Glu Ser Ser Asp Ala Leu Asp Ile Arg Gly
 465 470 475 480
 5
 Arg Tyr Ser Asp Ala Ala Lys Val Phe Ser Lys Leu Pro Asn Ala Asp
 485 490 495
 10
 Leu Leu Leu Asp Lys Phe Leu Glu Lys Ile Gly Tyr Ser Ser Tyr Lys
 500 505 510
 15
 Gln Ile Ile Met Ser Asn Pro Glu Gln Leu Asn Ser Ile Lys Ala Tyr
 515 520 525
 20
 Val Val Lys Glu Val Phe Glu Asn Phe Arg Glu Ser Glu Val Lys Lys
 530 535 540
 25
 Val Leu Ser Gly Glu Ser His Pro Glu Val Arg Asn Val Leu Met Asp
 545 550 555 560
 30
 Leu Thr Tyr Val Asp Leu Lys Ser Val Ile Gly Val Asn Gly Ala Asp
 565 570 575
 35
 Ile Asp Ser Ile Ile Ser Asn Pro Asp Val Met Leu Arg Thr Ala Val
 580 585 590
 40
 Leu Gly Lys Gly Asn Ala Ser Gly Ile Ser Leu Tyr Val Asp Asp Gln
 595 600 605
 45
 Lys Val Gly Glu Leu Ser Thr Glu Ala Gly Tyr Cys Val Lys Asn Leu
 610 615 620
 50
 Asp Thr Gly Lys Val Tyr Phe Met Phe His Asn Val Val Gly Met Ile
 625 630 635 640
 55
 Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Arg Ala Tyr Met Val Val Leu Glu Lys Asp
 645 650 655
 60
 Gly Lys Phe Thr Thr Ala Leu Val Asn Asn Ile Gln Lys Ala Ala Asp
 660 665 670
 65
 Gly Asn Val Val Trp Asp Asn Gln Phe Asn His Pro Asn Ile Asn Asn
 675 680 685
 70
 Leu His Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Leu Leu Asn Asp Ala Ser Val Lys
 690 695 700

ES 2 913 324 T3

	Asp	Tyr	Ser	His	Leu	Ala	Asp	Val	Lys	Phe	Asn	Lys	Asp	Asp	Thr	Val
	705					710					715					720
5	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Leu	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Asp
					725					730					735	
10	Asp	Asp	Val	His	Arg	Ala	Val	Val	Lys	His	Asp	Asp	Gln	Ile	Leu	His
				740					745					750		
15	Gln	Phe	Lys	Ser	Met	Ser	Phe	Tyr	Ile	Thr	Glu	Pro	Ser	Ala	Asp	Ser
			755					760					765			
20	Gly	Asp	Asn	Tyr	Gly	Ser	Asp	Phe	Phe	Ile	Ser	Asp	Glu	Gly	Lys	Asn
		770					775					780				
25	Leu	Arg	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys	Ala	Ile	Thr	His	Leu	Lys	Leu	Val	Asn
	785					790					795					800
30	Val	Asn	Gly	Asn	Asn	Lys	Leu	Val	Pro	Cys	Thr	Lys	Asp	Gly	Asn	Glu
				805						810					815	
35	His	Pro	Glu	Gly	Met	Pro	Ser	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Tyr	Arg	Tyr	Ile
				820					825					830		
40	Asp	Pro	Ile	Phe	Ala	His	Thr	Phe	Glu	Lys	Gln	Ser	Tyr	Ser	Lys	Asn
			835					840					845			
45	Ser	Ile	Ser	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Phe	Ser	Lys	Tyr	Lys	Glu	Gly	Ser
		850					855					860				
50	Met	Phe	Lys	Leu	Gln	His	Tyr	Ser	Asp	Asp	Tyr	His	Ile	His	Lys	Asp
	865					870					875					880
55	Glu	Gln	Gly	Asn	Val	Ile	Arg	Pro	Asn	Asn	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Lys
				885						890					895	
60	Val	Asp	Leu	Val	Tyr	Asp	Asp	Lys	Val	Ile	Gly	Met	Leu	Ser	Asp	Ser
			900						905				910			
65	Ile	Asn	Gln	Phe	Gln	Gly	Asp	Ile	Phe	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Asn	Tyr
			915					920					925			
70	Ser	His	Asn	Asp	Phe	Leu	Ser	Ser	Lys	Tyr	Phe	Gln	Lys	Val	Asn	Ile
		930					935					940				
75	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	Tyr	Ser	Gly	Arg	Tyr	Asp	Val	Gly	Asp
	945					950					955					960

ES 2 913 324 T3

Gly Asp Gln Ile Ala Gly Leu Asn Thr Asp Thr Gly Tyr Ser Asp Lys
 965 970 975

5 Ala Ile Phe Tyr Phe Lys Asn Asp Ser Ala Ser Thr Asp Met Pro Ala
 980 985 990

10 Ser Asp Val Thr Thr Ile Leu Pro Tyr Ile Asn Glu Leu
 995 1000 1005

<210> 13
 <211> 2172
 <212> ADN
 <213> Ehrlichia canis
 <400> 13

20 atggatagta taagtgcaaa tcacatacgc aatattttat tccttgtttt aggcgcattt 60
 tttggactgg aattttgctt ttatttatca ggtgtattat tcatcttaat ggtctgggga 120
 25 ccaaattacc tagattttaa tgctataaat ccagtttga gtgattttcc agacagaatt 180
 tggccaacta tttttgacta tgtacaacat tgggtggaaga acccttctgc atacgatgca 240
 gttttattac ttaagctaata aacgtcatta tgtacaccag taggtattct aagcatagta 300
 30 ttatggaacc ttagaaatat attattcgat tggaggccat ttaagaagaa agaactactg 360
 catggagatt caagatgggc aacagaaaaa gatattcgca aaataggatt acgtagtaga 420
 35 aaaggaatat tattagggaa agacaagaga ggatatctca ttgcagatgg atatcaacat 480
 gcattgttat ttgcaccaac tggatccgga aaaggtgtag gttttgtaat accaaactta 540
 40 ttattctggg aagattctgt agtagtacac gatataaaat tagagaacta tgatcttaca 600
 agtgggtgga gaaaaaaaaag gggacaagaa gttttcgtgt ggaaccacgc acaacctgac 660
 ggtataagtc actgttaciaa ccattagat tggataagct ctaagcctgg acaaatggta 720
 45 gatgatgtac aaaaaattgc caatctaata atgcctgaac aagatttttg gtataacgaa 780
 gcacgtagtt tatttgtagg agtagtatta tacttactag cagtaccaga aaaagtaaaa 840
 50 tcctttggag aagttgtaag aacaatgcgc agcgatgacg tagtctacaa cttagcagta 900
 gtactagaca caatagggaa aaagattcac ccagttgcat acatgaatat agctgcattt 960
 55 ttacaaaaag cagacaaaga acgctcaggt gttgtatcaa ctatgaactc atctttagaa 1020
 ttatgggcaa acccattaat agatacagca acagcatcaa gtgattttaa tattcaagaa 1080
 tttaaaagga aaaaagtaac agtatatggt ggattaacac cagataaatt aactcgtctt 1140
 60 agacctttaa tgcaggtatt ttatcaacaa gctacagaat ttttatgtag aactttacca 1200
 tcagatgatg aaccatatgg tgtactgttc ttaatggatg agtttccaac attaggaaaa 1260
 65 atggagcaat ttcaaacagg tatogcatat ttccgtggat atagagttag actatttttg 1320

ES 2 913 324 T3

attattcaag atactgaaca gcttaagggg atatatgaag aagcaggaat gaactcattc 1380
 ttatcaaact ctacttatag aataactttt gctgcaaata atatagaaac tgcaaattta 1440
 5 atatcacagt taataggaaa taaaactggt aaccaagagt ctttaaacag acctaaatth 1500
 ttagatttga accctgcatac acgttcatta catatatcag aaacacaaaag agctttacta 1560
 10 ttacctcaag aagtaataat gttaccocaga gatgagcaaa tacttttaaat agaacttact 1620
 taticctataa aatcaaagaa aataaaatac tatgaagaca aaaattttac aaaaaacta 1680
 ttaaagagta cctttgttcc aactcaagag ccttatgatc ccaacaaaac aaaaacagca 1740
 15 acaaaagaaa acgaagaacc tatgccaagt attgaaagcg atcttcctaa aaatacatct 1800
 gacaactactg aaaacaatat ggaagatggg gcaatgtaca gcagcataga agaagattat 1860
 20 gacgatgatg atgatgattt taattttgaa gacttagatg aatatatgga tgaagaagaa 1920
 gattatgatg atgaagaata tgatgatata gattatgatg ataataacaa tagtaatgag 1980
 25 gagtatgaag aagataatcc agaagaagat gacaatagca ataacttaga cgatgaggaa 2040
 gaggaagaag ataattattat agattatgaa gatgaagaag aatatgatga taacatagac 2100
 tacaagatg atgacaataa ctacaacaaa gataccactg acgatcaaga ctcaaaaaaa 2160
 30 cataatgaat ag 2172

<210> 14
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 14

40 Met Asp Ser Ile Ser Ala Asn His Ile Arg Asn Ile Leu Phe Leu Val
 1 5 10 15
 45 Leu Gly Ala Phe Phe Gly Leu Glu Phe Cys Phe Tyr Leu Ser Gly Val
 20 25 30
 50 Leu Phe Ile Leu Met Val Trp Gly Pro Asn Tyr Leu Asp Phe Asn Ala
 35 40 45
 55 Ile Asn Pro Ser Leu Ser Asp Phe Pro Asp Arg Ile Trp Pro Thr Ile
 50 55 60
 60 Phe Asp Tyr Val Gln His Trp Trp Lys Asn Pro Ser Ala Tyr Asp Ala
 65 70 75 80
 Val Leu Leu Leu Lys Leu Ile Thr Ser Leu Cys Thr Pro Val Gly Ile
 85 90 95

ES 2 913 324 T3

	Leu	Ser	Ile	Val	Leu	Trp	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Leu	Phe	Asp	Trp	Arg	
				100					105					110			
5	Pro	Phe	Lys	Lys	Lys	Glu	Ser	Leu	His	Gly	Asp	Ser	Arg	Trp	Ala	Thr	
			115					120					125				
10	Glu	Lys	Asp	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Leu	Arg	Ser	Arg	Lys	Gly	Ile	Leu	
		130					135					140					
15	Leu	Gly	Lys	Asp	Lys	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ile	Ala	Asp	Gly	Tyr	Gln	His	
	145					150					155					160	
20	Ala	Leu	Leu	Phe	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly	Val	Gly	Phe	Val	
					165					170					175		
25	Ile	Pro	Asn	Leu	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Ser	Val	Val	Val	His	Asp	Ile	
			180						185					190			
30	Lys	Leu	Glu	Asn	Tyr	Asp	Leu	Thr	Ser	Gly	Trp	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	
			195					200					205				
35	Gln	Glu	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Pro	Ala	Gln	Pro	Asp	Gly	Ile	Ser	His	
		210					215					220					
40	Cys	Tyr	Asn	Pro	Leu	Asp	Trp	Ile	Ser	Ser	Lys	Pro	Gly	Gln	Met	Val	
	225					230					235					240	
45	Asp	Asp	Val	Gln	Lys	Ile	Ala	Asn	Leu	Ile	Met	Pro	Glu	Gln	Asp	Phe	
					245					250					255		
50	Trp	Tyr	Asn	Glu	Ala	Arg	Ser	Leu	Phe	Val	Gly	Val	Val	Leu	Tyr	Leu	
				260					265					270			
55	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Lys	Val	Lys	Ser	Phe	Gly	Glu	Val	Val	Arg	Thr	
			275					280					285				
60	Met	Arg	Ser	Asp	Asp	Val	Val	Tyr	Asn	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Asp	Thr	
		290					295					300					
65	Ile	Gly	Lys	Lys	Ile	His	Pro	Val	Ala	Tyr	Met	Asn	Ile	Ala	Ala	Phe	
	305					310					315					320	
70	Leu	Gln	Lys	Ala	Asp	Lys	Glu	Arg	Ser	Gly	Val	Val	Ser	Thr	Met	Asn	
				325						330					335		
75	Ser	Ser	Leu	Glu	Leu	Trp	Ala	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Thr	Ala	Thr	Ala	
				340					345					350			

ES 2 913 324 T3

	Ser	Ser	Asp	Phe	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	Lys	Val	Thr	Val
			355					360					365			
5	Tyr	Val	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Pro	Leu	Met
		370					375					380				
10	Gln	Val	Phe	Tyr	Gln	Gln	Ala	Thr	Glu	Phe	Leu	Cys	Arg	Thr	Leu	Pro
	385					390					395					400
15	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Phe	Leu	Met	Asp	Glu	Phe	Pro
					405					410					415	
20	Thr	Leu	Gly	Lys	Met	Glu	Gln	Phe	Gln	Thr	Gly	Ile	Ala	Tyr	Phe	Arg
				420					425					430		
25	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Leu	Phe	Leu	Ile	Ile	Gln	Asp	Thr	Glu	Gln	Leu
			435					440					445			
30	Lys	Gly	Ile	Tyr	Glu	Glu	Ala	Gly	Met	Asn	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Ser
		450					455					460				
35	Thr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Phe	Ala	Ala	Asn	Asn	Ile	Glu	Thr	Ala	Asn	Leu
	465					470					475					480
40	Ile	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	Asn
				485						490					495	
45	Arg	Pro	Lys	Phe	Leu	Asp	Leu	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	His	Ile
			500						505					510		
50	Ser	Glu	Thr	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Ile	Met	Leu
			515					520					525			
55	Pro	Arg	Asp	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ile	Lys
		530					535					540				
60	Ser	Lys	Lys	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Lys	Asn	Phe	Thr	Lys	Lys	Leu
	545				550						555					560
65	Leu	Lys	Ser	Thr	Phe	Val	Pro	Thr	Gln	Glu	Pro	Tyr	Asp	Pro	Asn	Lys
					565					570					575	
70	Thr	Lys	Thr	Ala	Thr	Lys	Glu	Asn	Glu	Glu	Pro	Met	Pro	Ser	Ile	Glu
				580					585					590		
75	Ser	Asp	Leu	Pro	Lys	Asn	Thr	Ser	Asp	Asn	Thr	Glu	Asn	Asn	Met	Glu
			595					600					605			

ES 2 913 324 T3

Asp Gly Ala Met Tyr Ser Ser Ile Glu Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Asp
 610 615 620
 5 Asp Asp Phe Asn Phe Glu Asp Leu Asp Glu Tyr Met Asp Glu Glu Glu
 625 630 635 640
 10 Asp Tyr Asp Asp Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Asp Tyr Asp Asp Asn Asn
 645 650 655
 15 Asn Ser Asn Glu Glu Tyr Glu Glu Asp Asn Pro Glu Glu Asp Asp Asn
 660 665 670
 20 Ser Asn Asn Leu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asn Ile Ile Asp
 675 680 685
 25 Tyr Glu Asp Glu Glu Glu Tyr Asp Asp Asn Ile Asp Tyr Lys Asp Asp
 690 695 700
 30 Asp Asn Asn Tyr Asn Lys Asp Thr Thr Asp Asp Gln Asp Ser Lys Lys
 705 710 715 720
 35 His Asn Glu
 <210> 15
 <211> 688
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis
 <400> 15
 40 Met Asp Ile Asp Asn Asn Asn Val Thr Thr Ser Ser Thr Gln Asp Lys
 1 5 10 15
 45 Ser Gly Asn Leu Met Glu Val Ile Met Arg Ile Leu Asn Phe Gly Asn
 20 25 30
 50 Asn Ser Asp Glu Lys Val Ser Asn Glu Asp Thr Lys Val Leu Val Glu
 35 40 45
 55 Ser Leu Gln Pro Ala Val Asn Asp Asn Val Gly Asn Pro Ser Ser Glu
 50 55 60
 60 Val Gly Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 65 70 75 80
 65 Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys
 85 90 95

ES 2 913 324 T3

Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala
 100 105 110

5
 Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser
 115 120 125

10
 Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
 130 135 140

15
 Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu
 145 150 155 160

20
 His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu
 165 170 175

25
 Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp
 180 185 190

30
 Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys
 195 200 205

35
 Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 210 215 220

40
 Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu
 225 230 235 240

45
 Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala
 245 250 255

50
 Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser
 260 265 270

55
 Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
 275 280 285

60
 Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu
 290 295 300

65
 His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu
 305 310 315 320

Glu Asn Thr Pro Glu Val Arg Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp
 325 330 335

0Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu

ES 2 913 324 T3

Leu Asn Pro Met Pro Ser Ile Asp Asn Ile Asp Thr Asn Ile Ile Phe
 595 600 605
 5 His Tyr His Lys Asp Cys Lys Lys Gly Ser Ala Val Gly Thr Asp Glu
 610 615 620
 10 Met Cys Cys Pro Val Ser Glu Leu Met Ala Gly Glu His Val His Met
 625 630 635 640
 15 Tyr Gly Ile Tyr Val Tyr Arg Val Gln Ser Val Lys Asp Leu Ser Gly
 645 650 655
 20 Val Phe Asn Ile Asp His Ser Thr Cys Asp Cys Asn Leu Asp Val Tyr
 660 665 670
 25 Phe Val Gly Tyr Asn Ser Phe Thr Asn Lys Glu Thr Val Asp Leu Ile
 675 680 685
 30 <210> 16
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis
 <400> 16
 Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15
 35 Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys Lys Val
 20 25 30
 40 Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 35 40 45
 45 Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val
 50 55 60
 50 Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val
 65 70 75 80
 55 Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser
 85 90 95
 60 Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn
 100 105 110
 65 Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser
 115 120 125

ES 2 913 324 T3

	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	
	130						135					140					
5	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	
	145					150					155					160	
10	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	
					165					170					175		
15	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	
				180					185					190			
20	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	
			195					200						205			
25	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	
	210						215						220				
30	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	
	225					230					235					240	
35	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	
					245					250						255	
40	Thr	Pro	Glu	Val	Arg	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	
				260					265						270		
45	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	
			275					280						285			
50	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	
	290					295						300					
55	Val	Asp	Ser	Ser	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Lys	Lys	Val	
	305					310						315				320	
60	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	
					325					330					335		
65	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	
				340					345						350		
70	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	
			355					360						365			
75	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	
	370						375						380				

ES 2 913 324 T3

	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn
	385					390					395					400
5	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser
					405					410					415	
10	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser
				420					425					430		
15	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala
			435					440					445			
20	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val
	450						455					460				
25	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp
	465					470					475					480
30	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val
					485					490					495	
35	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val
				500					505					510		
40	Lys	Ala	Glu													
			515													
	<210> 17															
	<211> 36															
	<212> PRT															
	<213> Ehrlichia canis															
	<220>															
	<221> MISC_CHARACTERÍSTICA															
45	<222> (4)..(4)															
	<223> X significa cualquier aminoácido															
	<220>															
	<221> MISC_CHARACTERÍSTICA															
50	<222> (9)..(9)															
	<223> X significa cualquier aminoácido															
	<220>															
	<221> MISC_CHARACTERÍSTICA															
55	<222> (19)..(19)															
	<223> X significa cualquier aminoácido															
	<220>															
	<221> MISC_CHARACTERÍSTICA															
60	<222> (21)..(21)															
	<223> X significa cualquier aminoácido															
	<220>															
	<221> MISC_CHARACTERÍSTICA															
65	<222> (30)..(30)															
	<223> X significa cualquier aminoácido															

ES 2 913 324 T3

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (34)..(34)
 5 <223> X significa cualquier aminoácido

 <400> 17

 10 Lys Glu Glu Xaa Thr Pro Glu Val Xaa Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15

 Val Asp Xaa Ser Xaa Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Xaa Lys Val
 15 20 25 30

 Ser Xaa Thr Ser
 20 35

 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 25 <213> Ehrlichia canis

 <400> 18

 30 Cys Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser
 1 5 10 15

 Val Glu His

 35 <210> 19
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

 40 <400> 19

 Cys Glu Val Gly Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 1 5 10 15

 45 Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His
 20 25

 <210> 20
 <211> 37
 50 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

 <400> 20

 55

ES 2 913 324 T3

Cys Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro
 5 1 5 10 15

Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys
 10 20 25 30

Val Ser Glu Thr Ser
 15 35

<210> 21
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

20
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(15)
 <223> X significa cualquier aminoácido o ningún aminoácido

25
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (34)..(48)
 <223> X significa cualquier aminoácido o ningún aminoácido

30
 <400> 21

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

35
 Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu
 20 25 30

40
 His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 22

50
 Cys Thr Asn His Ile Glu His Asp Asp Tyr His Phe Thr Gly Pro Thr
 1 5 10 15

55
 Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu
 20 25 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 23

65

ES 2 913 324 T3

Cys Thr Asn His Ile Glu His Asp Asp Tyr His Phe Thr Gly Pro Thr
 1 5 10 15

5 Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu
 20 25 30

<210> 24
 <211> 27
 10 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

<400> 24

15 Cys Thr Gly Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu Lys
 1 5 10 15

20 Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
 20 25

<210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 25 <213> Ehrlichia canis

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 30 <223> X significa C o está ausente

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (4)..(4)
 35 <223> X significa H o Q

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (25)..(25)
 40 <223> X significa D o G

<400> 25

45 Xaa Met Leu Xaa Val Gln Asn His Val Asp Gln His Thr Asn His Ile
 1 5 10 15

50 Glu His Asp Asp Tyr His Phe Thr Xaa Pro Thr
 20 25

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

55 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> X significa C o está ausente

60 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (14)..(14)
 <223> X significa G o D

65 <400> 26

ES 2 913 324 T3

Xaa Thr Asn His Ile Glu His Asp Asp Tyr His Phe Thr Xaa Pro Thr
1 5 10 15

Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu
20 25 30

5
 <210> 27
 <211> 27
 10
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 15
 <222> (1)..(1)
 <223> X significa C o está ausente
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 20
 <222> (3)..(3)
 <223> X significa G o D
 <400> 27

Xaa Thr Xaa Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu Lys
1 5 10 15

Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
20 25

25
 30
 <210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 35
 <213> Ehrlichia canis
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 40
 <223> X significa C o está ausente
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (14)..(14)
 45
 <223> X significa G o D
 <400> 28

Xaa Thr Asn His Ile Glu His Asp Asp Tyr His Phe Thr Xaa Pro Thr
1 5 10 15

50
 55
 <210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis
 60
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> X significa C o está ausente
 65
 <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(1)
 <223> X significa G o D

5

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca de forma natural

10

<400> 29

Xaa	Thr	Xaa	Pro	Thr	Ser	Phe	Glu	Val	Asn	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys
1				5					10						15

15

Met Glu Leu

<210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

20

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> X significa C o está ausente

25

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (14)..(14)
 <223> X significa G o D

30

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (25)..(25)
 <223> X significa E o G

35

<400> 30

Xaa	Thr	Asn	His	Ile	Glu	His	Asp	Asp	Tyr	His	Phe	Thr	Xaa	Pro	Thr
1				5					10						15

40

Ser	Phe	Glu	Val	Asn	Leu	Ser	Glu	Xaa	Glu	Lys	Met	Glu
			20					25				

45

<210> 31
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Ehrlichia canis

50

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> X significa C o está ausente

55

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(3)
 <223> X significa G o D

60

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (14)..(14)
 <223> X significa E o G

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de un anticuerpo o sus fragmentos de unión al antígeno que son específicos para *E. canis*, en una muestra de prueba canina o humana, en donde la muestra de prueba se selecciona del grupo que consiste en plasma, sangre, suero, saliva, orina, heces fecales, exudado de heridas, líquido cefalorraquídeo (CSF), semen, esputo, extractos de tejidos y extractos celulares, que comprende:
- (a) poner en contacto con la muestra de prueba con uno o más polipéptidos purificados que consisten en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32; o uno o más polipéptidos purificados que tienen al menos 95 % de identidad a las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32; en donde el uno o más polipéptidos purificados se unen específicamente a un anticuerpo que es específico para *E. canis*, en condiciones adecuadas para la unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno; y
- (b) detectar la presencia de unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno;
- en donde la presencia de unión específica del uno o más polipéptidos purificados a los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno indica la presencia de los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno específicos para *E. canis* en la muestra de prueba.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más polipéptidos purificados se unen a una secuencia de aminoácidos heterólogos, un reactivo indicador, un separador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de transmembrana, un ligando para purificación de proteínas, o una de sus combinaciones.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende además detectar la cantidad de unión específica.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más polipéptidos purificados se inmovilizan a un soporte sólido.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de la unión específica del uno o más polipéptidos purificados a anticuerpos específicos para *E. canis* en la muestra de prueba indica que el canino o humano se ha infectado con *E. canis*.
6. El método de la reivindicación 5, que comprende además determinar si los anticuerpos en la muestra de prueba se unen específicamente a uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados que son antígenos vacunales de *E. canis*, en donde si los anticuerpos en la muestra de prueba se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el canino o el humano se ha infectado con *E. canis* y se desconoce el estado de vacunación contra *E. canis*;
- en donde si los anticuerpos en la muestra de prueba no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos de *E. canis* purificados y se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el canino o el humano no se ha infectado con *E. canis* y se ha vacunado contra *E. canis*;
- y
- en donde si los anticuerpos en la muestra de prueba no se unen específicamente al uno o más primeros polipéptidos purificados y no se unen específicamente al uno o más segundos polipéptidos purificados, entonces el canino o el humano no se ha vacunado contra *E. canis* y no se ha infectado con *E. canis*.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
8. Una composición que comprende uno o más polipéptidos purificados que consisten en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
10. Un método para monitorear el tratamiento de una infección por *E. canis* en un paciente canino o humano que comprende:
- (a) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una primera muestra de prueba del paciente antes o en las primeras etapas de un tratamiento para una infección por *E. canis* por un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la muestra de prueba se selecciona del grupo que consiste en plasma, sangre, suero, saliva, orina, heces fecales, exudado de heridas, líquido cefalorraquídeo (CSF), semen, esputo, extractos de tejidos y extractos celulares;
- (b) determinar el nivel de anticuerpos anti-*E. canis* en una segunda muestra de prueba del paciente después de efectuar el tratamiento mediante un método de acuerdo con la reivindicación 5; y

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

5

FIGURA 1

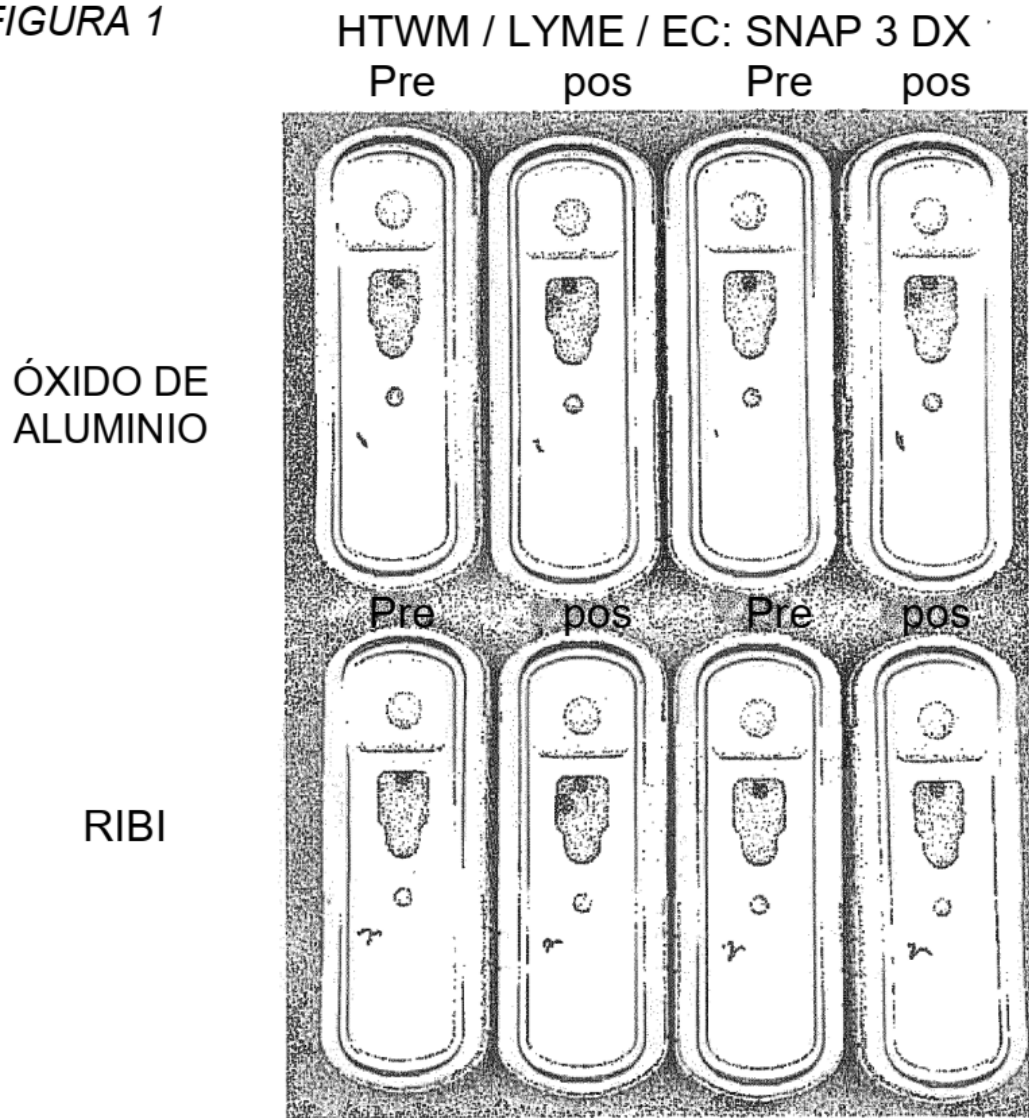


FIGURA 2

ANÁLISIS DE GEL 2D DE *E. canis*
AISLADA - TEÑIDA CON COOMASIE
BIOSAFE AZUL

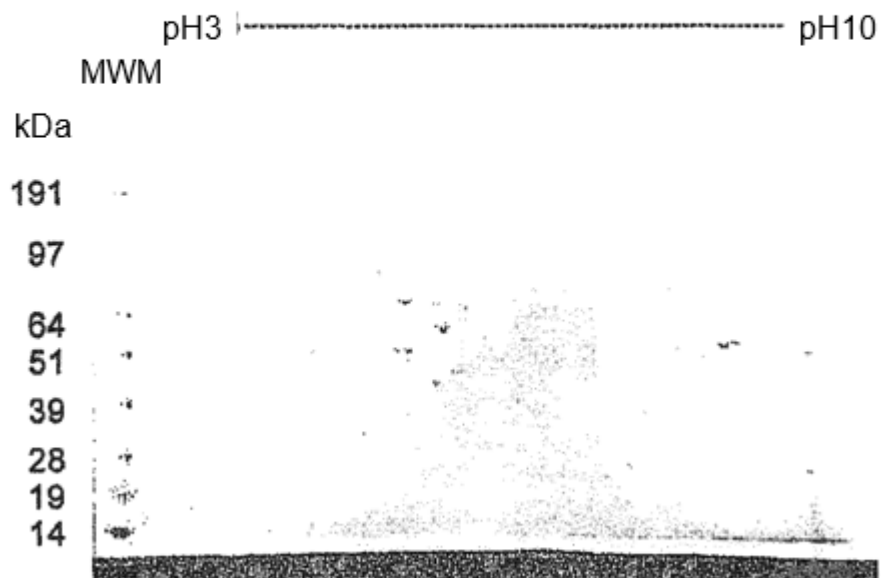


FIGURA 3

INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN DE PROTEÍNAS DE *E. Canis* RESUELTO MEDIANTE EL USO DE GELES 2D PROBADOS CON PLASMA CANINA NORMAL.

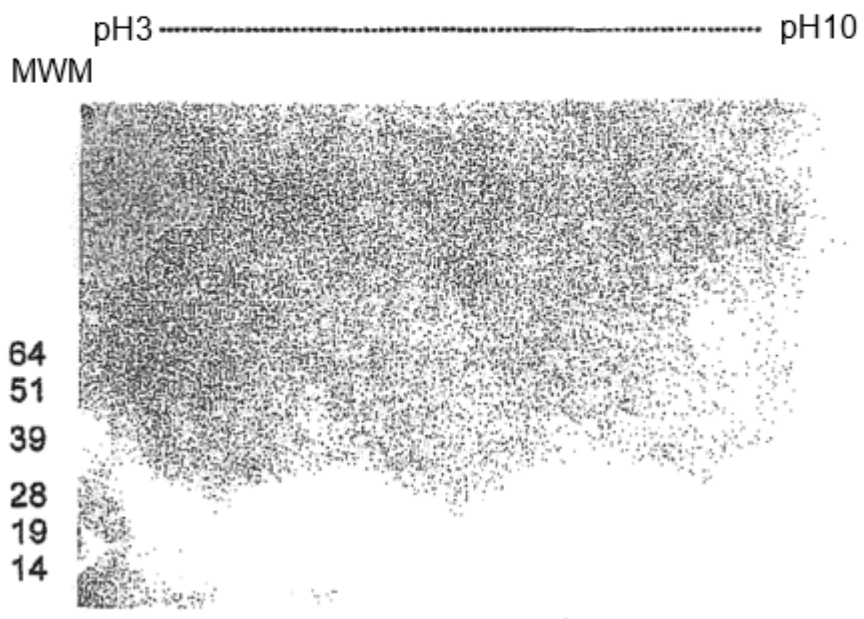


FIGURA 4

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

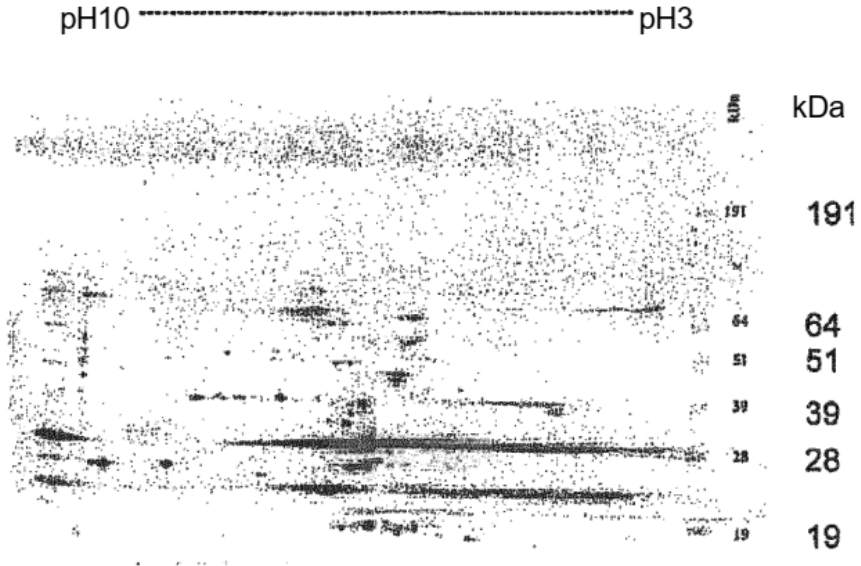


FIGURA 5

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

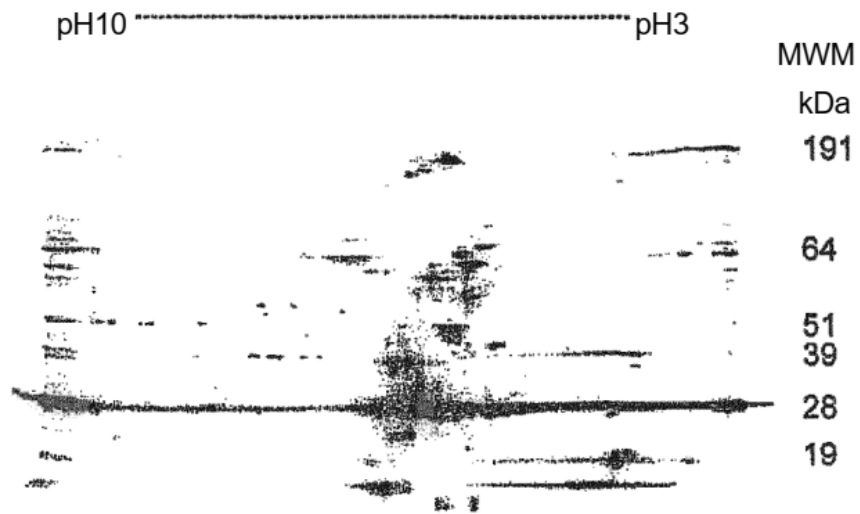


FIGURA 6

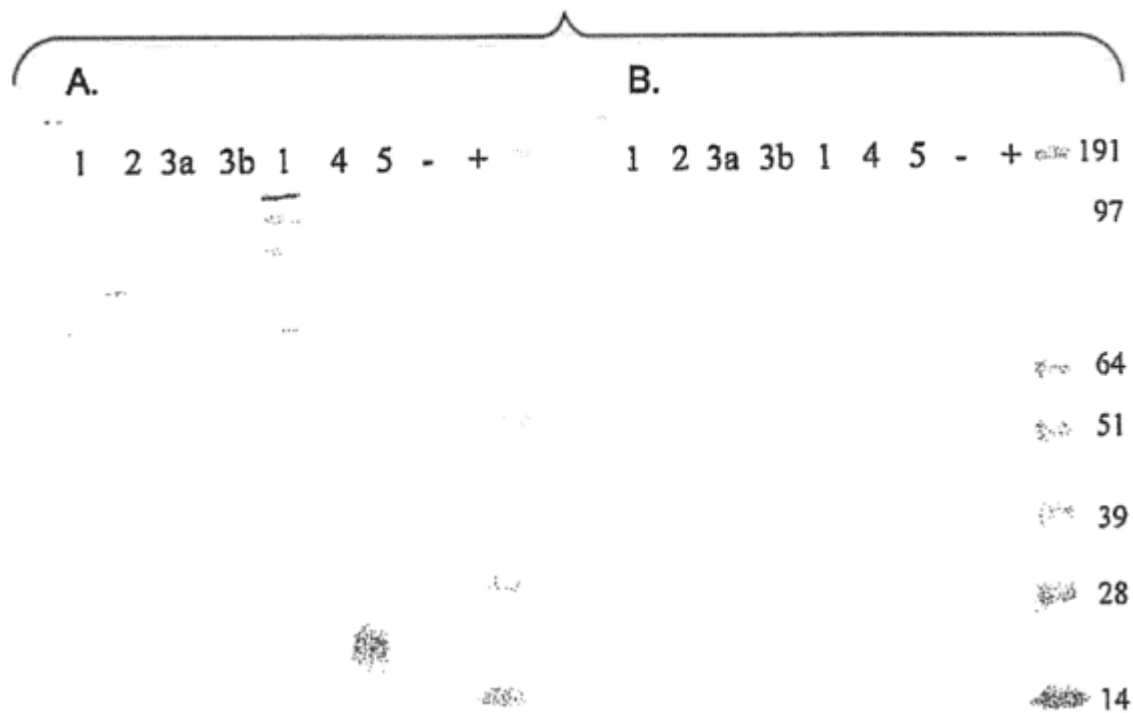
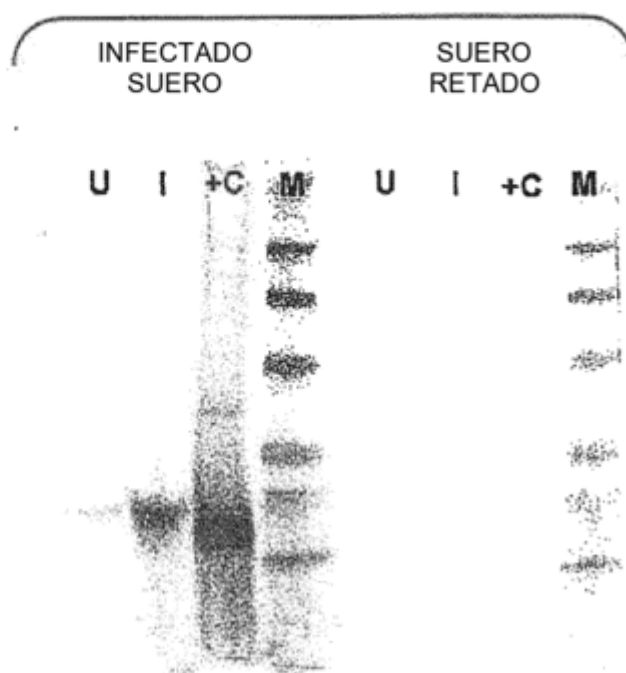


FIGURA 7



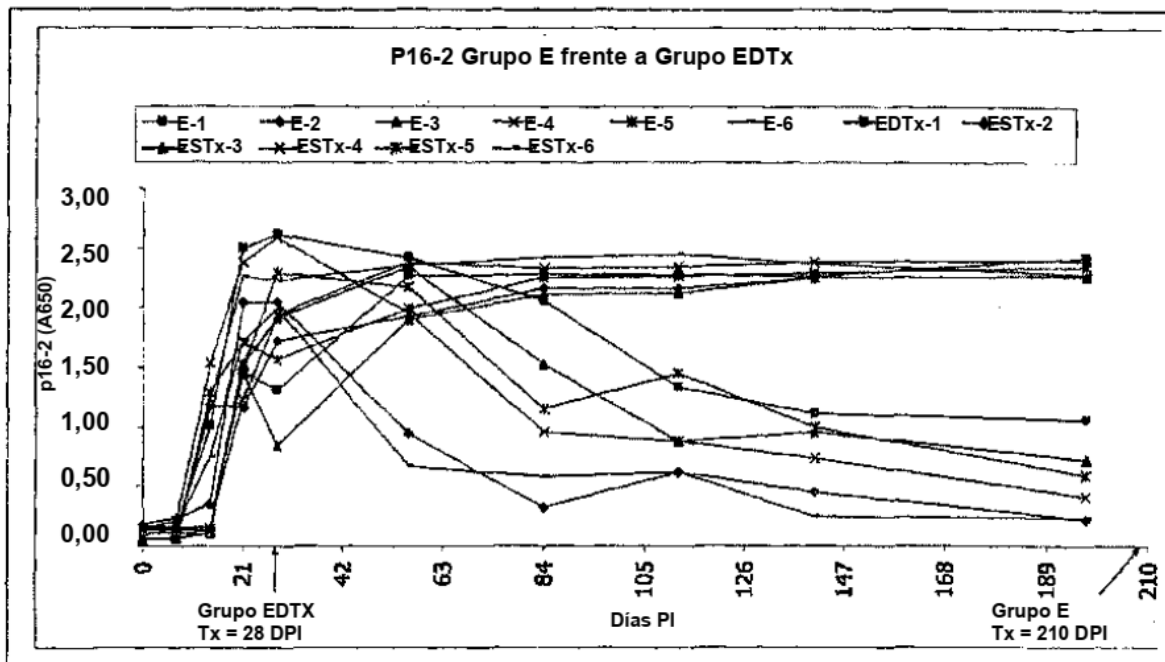


Figura 8

**Perros de control – sin tratamiento previo
(sin exposición previa a antígenos)**

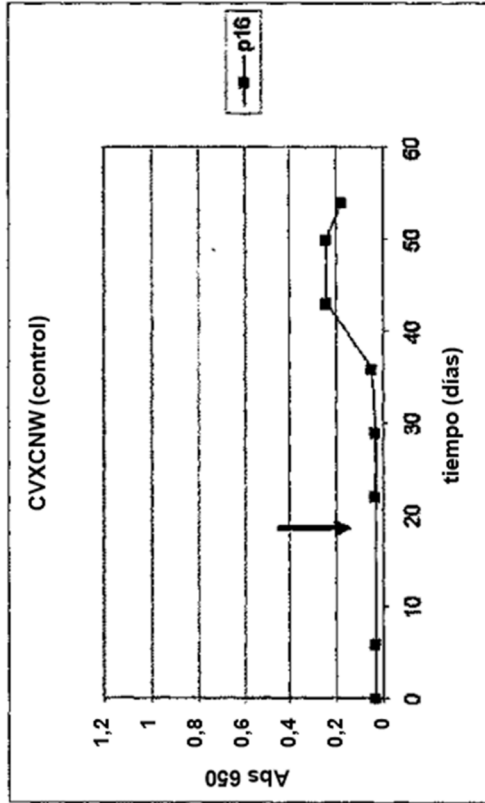


Figura 9A

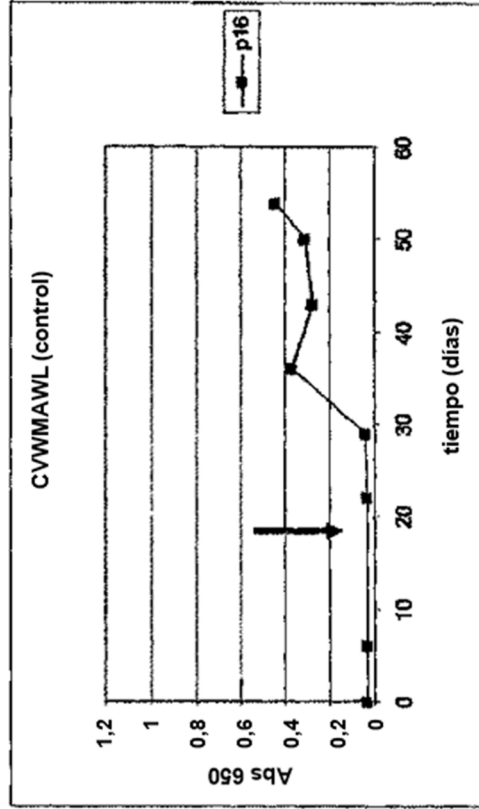


Figura 9B

Perros vacunados: adyuvante RIBI

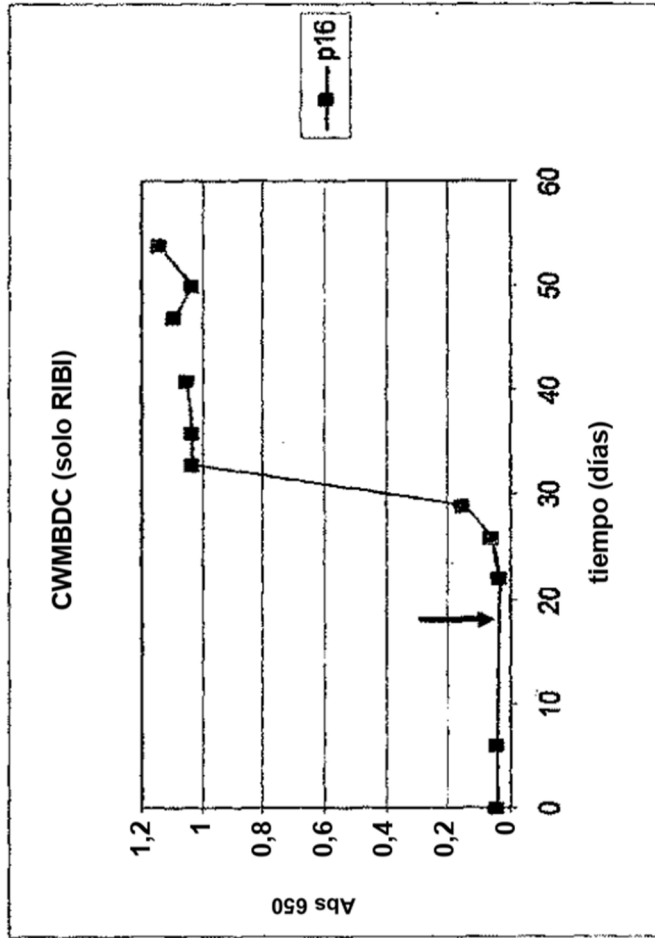


Figura 10A

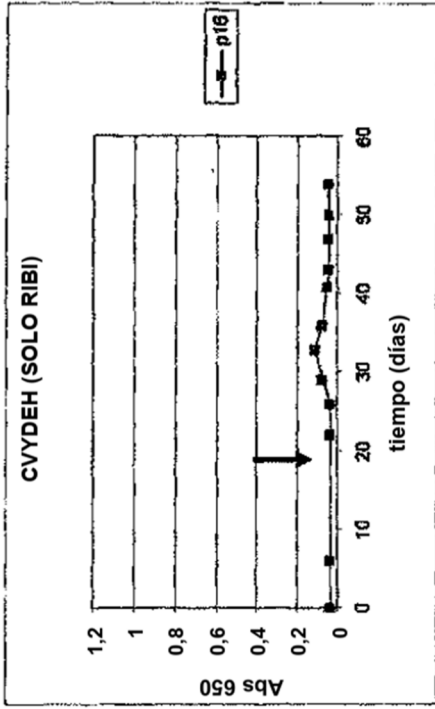


Figura 10B

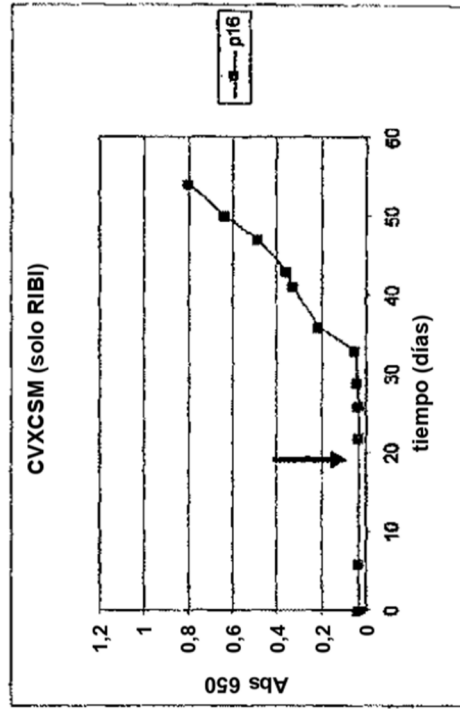


Figura 10C

Perros vacunados - RIBI + adyuvante de BCG

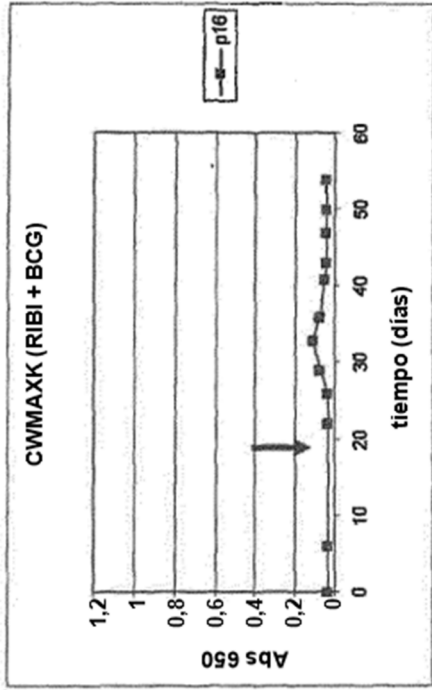


Figura 11B

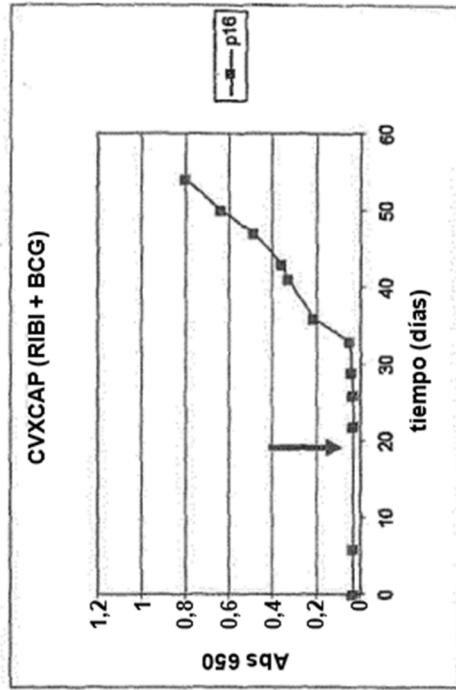


Figura 11C

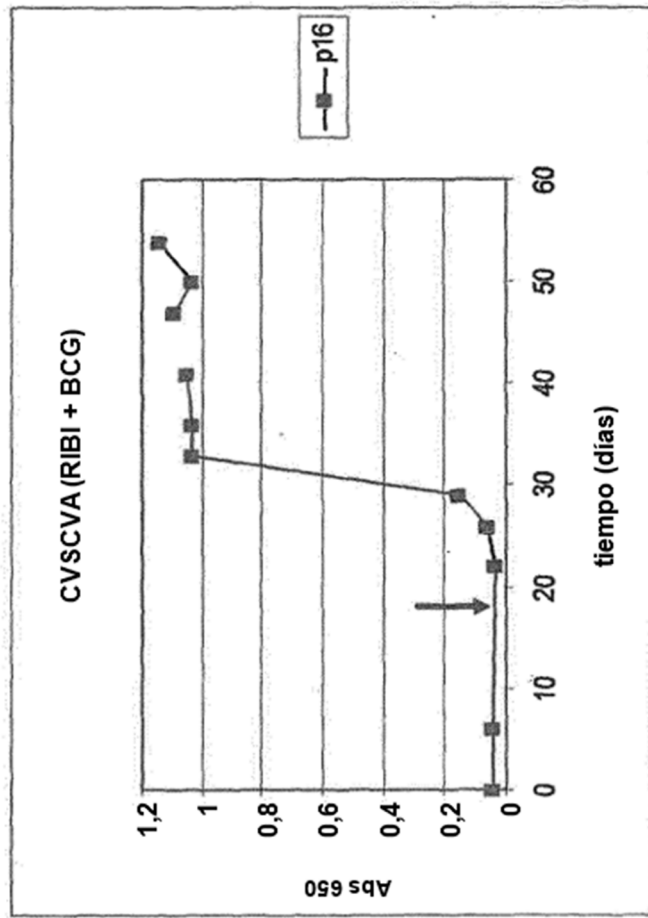


Figura 11A