



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 323 113**

② Número de solicitud: 200701831

⑤ Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/563** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **29.06.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2009**

Fecha de la concesión: **14.04.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **26.04.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**26.04.2010**

⑰ Titular/es: **Bioseguridad y Análisis Inmunológicos  
J.A.F., S.L.  
c/ Zamora, 50 - 5º C  
37002 Salamanca, ES**

⑱ Inventor/es: **Simón Martín, Fernando;  
Marcos-Atxutegi, Cristina;  
Gandolfi, Bárbara;  
Arangüena Rodríguez, Teresa y  
Ramírez Villaescusa, Javier**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Fracción antigénica de *Ascaridia galli*, anticuerpos específicos frente a la misma y métodos de detección del patógeno.**

㉑ Resumen:

Fracción antigénica de *Ascaridia galli*, anticuerpos específicos frente a la misma y métodos de detección del patógeno.

La presente invención se refiere a una fracción antigénica específica del parásito *Ascaridia galli* de entre 20 y 60 KDa, anticuerpos específicos frente a dicha fracción, así como a métodos que permitan la identificación del parásito en estadios tempranos de la infección.

ES 2 323 113 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Fracción antigénica de *Ascaridia galli*, anticuerpos específicos frente a la misma y métodos de detección del patógeno.

La presente invención se refiere a una fracción antigénica específica del parásito *Ascaridia galli* de entre 20 y 60 KDa, anticuerpos específicos frente a dicha fracción, así como a métodos que permitan la identificación del parásito en estadios tempranos de la infección.

**Estado de la técnica anterior**

*Ascaridia galli* es un nematodo intestinal que infecta tanto a las aves silvestres como a las domésticas, todas ellas pertenecientes al orden de las gallináceas, y resultando especialmente problemática en las explotaciones de gallinas (*Gallus gallus*) y pavos (*Meleagris gallopavo*). Los hospedadores resultan infectados por ingestión de huevos embrionados del parásito (con las larvas de segundo estadio, L2) depositados en el suelo con las heces de aves infectadas. Por esta razón, la adopción de un tipo “tradicional” de cría en el suelo, o similares (sistemas orgánicos o de cama de paja), implica un riesgo importante de diseminación en las granjas comerciales, en las que las aves suelen encontrarse hacinadas. Diversos estudios han demostrado prevalencias elevadas de *A. galli* en aves de corral de diversas partes del mundo. Un diagnóstico precoz eficaz, capaz de detectar el parásito antes de que sus huevos aparezcan en las heces de las aves parasitadas, es la herramienta primaria para ejercer un control adecuado sobre los parásitos.

Aunque hay estudios previos que han permitido la detección de la presencia *A. galli* en sangre de gallinas infectadas naturalmente, mediante las técnicas de ELISA y Western blot (Martín-Pacho et al., (2005) *J. Vet. Med. Series B*, 52: 238-242), dicha detección se produce en estadios ya muy avanzados de la enfermedad cuando ésta ya es crónica, no posibilitando atajar la diseminación del nematodo. Persiste por tanto la necesidad avanzar en el diagnóstico temprano de la enfermedad antes de que los animales comiencen a eliminar los huevos del parásito a través de las heces y el nematodo se propague.

**Breve descripción de la invención**

Las investigaciones realizadas se han enfocado a avanzar en el diagnóstico de esta enfermedad poniendo a punto un método de ELISA capaz de detectar tempranamente al parásito, tanto en suero como en yema de huevo, con el objetivo de identificar las aves parasitadas antes de que *A. galli* comience a eliminar sus huevos con las heces de las gallináceas parasitadas y se extienda a toda la explotación. De este modo, los autores de la presente invención han descubierto, sorprendentemente, una serie de fracciones antigénicas que contribuye han permitido desarrollar métodos que posibilitan la detección temprana de *A. galli* en aves, preferentemente del Orden de las Gallináceas.

Así un primer aspecto de la presente invención se refiere a una fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma obtenibles a partir de una muestra biológica, perteneciente a una especie del Orden de las Gallináceas e infectada por *Ascaridia galli*, por un método que comprende los siguientes pasos: a) someter la muestra a medios que permitan la separación de sus diferentes fracciones antigénicas en función de su peso molecular. Esta separación puede realizarse por técnicas que comprenden sin ningún tipo de limitación: electroforesis, cromatografía de presión alta o media presión, etc., b) aislar la fracción comprendida entre los 20 y 60 kDa o fragmentos de la misma.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica pertenece a cualquiera de las especies *Gallus gallus* o *Meleagris gallopavo*. En una realización todavía más preferida los fragmentos de la fracción antigénica de 20 a 60 KDa son seleccionados de cualquiera de los siguientes: i) 29-34 KDa, ii) 43-54 KDa, ó iii) 56-65 KDa. Y más preferentemente de los siguientes: 48-50 KDa ó 45 KDa. En adelante la fracción antigénica de 20 a 60 KDa y los fragmentos de ésta serán denominados como “fracción antigénica y fragmentos antigénicos de la invención”.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de interactuar con la fracción antigénica o fragmentos antigénicos de la invención. En adelante estos anticuerpos serán denominados como “anticuerpos de la invención”.

Un tercer aspecto de la invención está referido a un método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica de una especie perteneciente al orden de las gallináceas, preferentemente a *Gallus gallus* o *Meleagris gallopavo*, potencialmente infectada que comprende: a) poner en contacto la muestra aislada con la fracción antigénica o fragmentos antigénicos de la invención, b) detectar la interacción de los anticuerpos contenidos en la muestra con la fracción antigénica o fragmentos de la misma del paso a), donde la detección positiva de la interacción es indicativa de la presencia de *Ascaridia galli* en la muestra. En una realización preferida de este aspecto de la invención la detección temprana de *Ascaridia galli* es llevada a cabo mediante un anticuerpo secundario marcado y capaz de interactuar con los anticuerpos fijados a la fracción antigénica o fragmentos de la misma.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica de una especie perteneciente al orden de las gallináceas, preferentemente a *Gallus gallus*

o *Meleagris gallopavo*, potencialmente infectada que comprende: a) poner en contacto una muestra aislada con los anticuerpos de la invención, b) detectar la interacción de los anticuerpos con la fracción antigénica o fragmentos de la invención, donde la detección positiva de la interacción es indicativa de la presencia de *Ascaridia galli* en la muestra.

5

En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención la muestra potencialmente infectada procede, sin ningún tipo de limitación, de huevo, sangre, suero, ó heces.

Un quinto aspecto de la invención se relaciona con un kit de detección para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica de una especie perteneciente al orden de las gallináceas, preferentemente a *Gallus gallus* o *Meleagris gallopavo*, potencialmente infectada que comprende: a) la fracción antigénica o fragmentos de la invención y/o b) los anticuerpos de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de la fracción antigénica o fragmentos antigénicos de la invención para la obtención de anticuerpos que permiten la detección temprana de *Ascaridia galli*.

#### Definiciones

Anticuerpo: a lo largo de la descripción, este término hará referencia tanto a anticuerpos monoclonales como policlonales.

Fragmentos de anticuerpos: a lo largo de la descripción, este término hará referencia a todos aquellos fragmentos de anticuerpos capaces interaccionar frente a la región antigénica de la invención o fragmentos de la misma, comprendiendo además dichos fragmentos de anticuerpos a las regiones variables Vh y/o VI de los anticuerpos.

25

Kit de detección: a lo largo de la descripción se entenderá por kit de análisis o detección cualquier tipo de soporte o recipiente que permita llevar a cabo el método de la invención. Este kit puede comprender, sin ningún tipo de limitación, todos aquellos reactivos, tampones, etc. que permitan la puesta a punto del mismo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Respuesta de anticuerpos IgG contra el complejo antigénico de adultos de *A. galli* en gallinas infectadas experimentalmente, medidas mediante ELISA. 1A. Respuesta en suero. 1B. Respuesta en yema de huevo.

40

Figura 2.- Identificación mediante Western blot de moléculas implicadas en la respuesta temprana contra el complejo antigénico de adultos de *A. galli* en sangre A. Previo a la infección. B. Dos semanas post-infección. C. Tres semanas post-infección.

Figura 3.- Identificación mediante Western blot de moléculas implicadas en la respuesta temprana contra el complejo antigénico de adultos de *A. galli* en yema de huevo. A. Previo a la infección. B. Cuatro semanas p.i. (post-infección). C. Ocho semanas p.i. D. Doce semanas p.i.

Figura 4.- Presencia de huevos del parásito en las heces de las gallinas infectadas. La flecha indica el momento en el que puede detectarse la presencia del parásito mediante ELISA en la yema de huevo de la gallina.

Figura 5.- Tabla en la que se observa la respuesta de anticuerpos IgG contra la fracción antigénica Fag20-60 de *A. galli*, medida por ELISA en yema de huevos. Las flechas indican los momentos en los que se detecta la parasitosis mediante ELISA Fag20-60. \*Significación estadística respecto del momento previo a la infección (momento 0).

55

Figura 6.- Western blot realizado a partir de antígeno completo de gusanos de *Ascaridia galli* (A), y la fracción purificada de 20-60 KDa (B). En esta última, los sueros de gallinas infectadas reconocen dos bandas de 48/50 y 45 kDa, responsables de la reactividad.

60

#### Descripción detallada de la invención

A continuación se detallan los materiales y métodos que han sido empleados para el desarrollo de la presente invención, así como sus ejemplos de realización. Dichos ejemplos no limitan la invención, sino que su finalidad es ilustrarla, poniendo de manifiesto la eficiencia y eficacia del método de la invención.

65

## ES 2 323 113 B1

### Material es y métodos

#### 1.- Obtención de huevos embrionados del parásito

5 Vermes adultos de *A. galli* fueron recogidos del intestino delgado de gallinas ponedoras infectadas naturalmente. Una vez realizada la histerectomía de las hembras encontradas, los huevos contenidos en los úteros se liberaron y se colocaron en una solución de dicromato potásico al 4% durante 14 días a 20°C hasta su embrionación (aparición de las larvas infectantes, L2).

10

#### 2.- Infecciones experimentales y recogida de huevos de las gallinas

Doce gallinas Lohmann Braun de 3 meses de edad, libres de parásitos intestinales, fueron infectadas por vía oral con dosis individuales de 200 huevos embrionados de *A. galli* (Permin *et al.*, (1997) *J. Vet. Med. Series B*, 52: 238-242), obtenidos como se indica en el apartado anterior, mediante pipetas Pasteur.

15

Las gallinas fueron sangradas antes de la infección y semanalmente entre 0 y 104 días/15 semanas post-infección (p.i.). Todos los huevos puestos por las gallinas fueron recogidos desde el momento del comienzo de la puesta, durante el período señalado anteriormente. Los sueros se alicuotaron sin diluir y las yemas de cada huevo se alicuotaron 1:2 de PBS pH 7.2. Ambos materiales se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

20

#### 3. Antígenos

25 Se emplearon secuencialmente un complejo antigénico de vermes adultos y fracciones antigénicas de peso molecular definido, aisladas de dicho complejo antigénico.

a. *Complejo antigénico de vermes adultos.*- Vermes adultos obtenidos de gallinas infectadas naturalmente fueron macerados en PBS estéril pH 7.2 y sometidos a ultrasonidos en frío, mediante 3 ciclos de 1 minuto cada uno, a 70 kHz, con intervalos de 3 minutos. El extracto resultante fue centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue considerado el extracto acuoso de antígenos (SA) y se descartó el sedimento. El contenido proteico se midió mediante el método de Bradford (Bradford (1976) *Ann. Biochem.* 72, 248-254) y fue ajustado a 4 µg/µl de concentración final.

30

b. *Fracciones antigénicas.*- El extracto antigénico completo se sometió a electroforesis desnaturalizante para separar las proteínas en geles de poliacrilamida de 12% según el método descrito por Laemmli (Laemmli (1970) *Nature* 227, 680-685). Una vez realizada la electroforesis, se cortó la parte de los geles que contenía la fracción las proteínas de peso molecular (Pm) entre 20 y 60 kDa (Fag20-60). La pieza de gel se troceó en porciones lo más pequeñas posible y estas fueron sumergidas en PBS pH 7.2 durante toda la noche a 4°C, para eluir las proteínas. El contenido proteico se midió de la misma manera que en el caso anterior, y su concentración final se ajustó a 2 µg/µl mediante filtrado a través de centricones de 4 kDa de exclusión.

35

40

#### 4. Análisis inmunológicos (ELISA)

45

Se realizó según la metodología descrita por Prieto *et al.* (Prieto *et al.* (1997) *Vet. Parasitol.* 70, 209-217) con algunas modificaciones, inicialmente se empleó el SA para analizar la evolución de la respuesta de anticuerpos a lo largo de todo el período de estudio (104 días/15 semanas), tanto en suero como en yema de huevo. Posteriormente, se empleó la fracción antigénica Fag20-60 para determinar si era posible de identificar una respuesta precoz de IgGs.

50

El ELISA SA se realizó en las siguientes condiciones:

- Tapizado de las microplacas con 0.8 mg/pocillo del extracto SA
- Los sueros se analizaron diluidos en PBS pH 7.2, 1:400 y las yemas 1:40
- El anticuerpo secundario IgG anti-pollo marcado con peroxidasa se empleó diluido 1:8000.

55

El ELISA Fag20-60 se realizó en las siguientes condiciones:

- Tapizado de las microplacas con 0.8 mg/pocillo del extracto Fag20-60
- Los sueros se analizaron diluidos en PBS pH 7.2, 1:100 y las yemas 1:20
- El anticuerpo secundario IgG anti-pollo marcado con peroxidasa se empleó diluido 1:4000.

65

Las incubaciones de los sueros, las yemas y el anticuerpo secundario duraron 1 h. y se realizaron a 37°C. Las densidades ópticas (D.O.s) se midieron a 492 nm en un lector Easy-Reader de BioRad.

## ES 2 323 113 B1

- *Western blot*.- Esta técnica se realizó como se describe en Prieto *et al.* (Prieto *et al.* (1999) *Vet. Parasitol.* 86, 5-13) con algunas modificaciones. El antígeno empleado fue el complejo antigénico de adultos. Se analizaron muestras de suero (dilución 1:200) de las gallinas infectadas experimentalmente obtenidas antes de la infección y a las 2 y 3 semanas p.i. Así mismo, se analizaron las yemas de huevos puestos por las mismas gallinas, diluidas a 1:40, del momento previo a la infección y de 4, 8 y 12 semanas p.i. El anticuerpo secundario marcado (anti-IgG anti-pollo con peroxidasa) se aplicó a dilución 1:2000.

- *Análisis de heces de gallinas*.- Las heces fueron analizadas mediante la técnica de flotación con sulfato de zinc para detectar huevos del parásito. Las muestras que contenían al menos un huevo fueron consideradas positivas.

- *Análisis estadísticos*.- El test no paramétrico de Kruskal-Wallis se empleó para comparaciones múltiples de los datos inmunológicos. Se definió una diferencia significativa como un valor de  $p < 0.5$  para un límite de confianza del 95%. Para comparaciones pareadas se aplicó el test de Wilcoxon. También en este caso un valor de  $p < 0.5$  fue considerado como indicativo de diferencias significativas.

### Ejemplos de realización

#### Ejemplo 1

##### *Evolución de la respuesta de anticuerpos IgG anti-A. galli contra el complejo antigénico de adultos*

La evolución de la respuesta de anticuerpos IgG contra el complejo antigénico de adultos (SA) en suero de gallinas experimentalmente infectadas se muestra en la figura 1A. Entre el momento previo a la infección y el día 20 post-infección (3 semanas p.i.) se produce un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de las D.O.s medias. Desde el día 20 p.i. hasta el final del estudio (día 104 p.i./15 semanas pi.), se producen fluctuaciones de las D.O.s, pero no se detectaron diferencias significativas entre ellas. No obstante, todos los valores obtenidos a partir de la 3ª semana fueron significativamente mayores ( $p < 0.5$ ) que la media obtenida previamente a la infección.

La evolución de la respuesta de IgG contra el complejo antigénico de adultos en yemas de huevos de las gallinas infectadas se muestra en la figura 1B. Entre el momento previo a la infección y el día 42 p.i./6ª semana p.i. se produce un incremento continuo de las Densidades Ópticas Medias, que son significativamente superiores a aquellas del momento previo a la infección a partir del día 27/4ª semana p.i. (incluido este) ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se producen fluctuaciones de menor entidad que las detectadas en el suero. Todos los valores medios alcanzados, a partir del día 27 p.i. y la 4ª semana p.i., fueron significativamente mayores que aquellos obtenidos en el momento previo a la infección ( $p < 0.05$ ).

#### Ejemplo 2

##### *Identificación de respuesta temprana de anticuerpos en sangre y yema de huevo*

Mediante la técnica de Western blot se determinaron las moléculas del complejo antigénico de adultos que estimulan una respuesta de IgG temprana (figura 2). A las 2 semanas p.i. se detecta ya una cierta reactividad estimulada por tres grupos de antígenos de aproximadamente 29-34, 48-54 y 56-65 kDa. A las 3 semanas p.i. la reactividad es mucho más intensa, produciéndose en todo el rango molecular, pero siendo especialmente intensa contra algunos de los antígenos antes citados.

En la yema de los huevos (figura 3), la reactividad comienza a detectarse en los huevos puestos 4 semanas p.i., intensificándose y extendiéndose contra antígenos de Pm medio y bajo, pero no contra los antígenos de alto Pm. A las 4 semanas p.i. se detecta reactividad contra un pequeño grupo de antígenos en torno a 48-54 kDa. A las 8 semanas pi., además de mantenerse la reactividad a dichos antígenos, se revelan bandas en el rango molecular comprendido entre 54 y 7 kDa, hecho que se mantiene en los huevos puestos 12 semanas p.i.

#### Ejemplo 3

##### *Aislamiento de moléculas que actúan como marcadores precoces de infección*

Teniendo en cuenta que tanto en sangre como en yema de huevo los primeros antígenos que son reconocidos por los anticuerpos IgG anti-A. galli son los de pesos moleculares (Pm) comprendido entre 20 y 60 kDa, se procedió a la elución de esta fracción a partir de geles en los que previamente se había realizado la separación electroforética de las proteínas del complejo antigénico. Esta fracción antigénica es la que posteriormente se empleó para la detección temprana de A. galli por ELISA.

Esta fracción de 20 y 60 KDa fue sometida a Western blot con suero de gallinas infectadas observándose la presencia de dos bandas especialmente reactivas de aproximadamente 48/50 y 45 kDa.

## ES 2 323 113 B1

### Ejemplo 4

#### *Análisis de la evolución de la excreción de huevos de A. galli en heces*

5 La curva de excreción de huevos del parásito en heces de las gallinas se representa en la figura 4. Los huevos comienzan a aparecer en las heces a los 41 días en algunas gallinas y a los 49 días post-infección en la mayoría y en cantidades fácilmente detectables. Se observa un primer pico de eliminación de huevos a la 8ª semana p.i. y el máximo a la 11ª semana p.i. Después el número de huevos detectado disminuye hasta el final del experimento.

10

### Ejemplo 5

#### *Detección precoz de infecciones por A. galli mediante enzimo-inmuno ensayo (ELISA)*

15 Los cambios en los anticuerpos IgG anti-*A. galli* en suero y yema de huevo, medidos por ELISA Fag20-60, se representan en la figura 5. No se detectaron anticuerpos en los sueros ni en las yemas de huevos recogidos previamente a la infección (D.O.s medias 0,110 y 0,254, respectivamente).

20 En los sueros se detecta una reactividad intensa (D.O. 1,525) a la tercera semana p.i. que es significativamente más elevada que la del momento inicial ( $p < 0,005$ ). Dicha reactividad se mantiene a la cuarta semana p.i. con un ligero descenso. En la yema se detectan diferencias significativas respecto del momento inicial a las 4 semanas p.i. ( $p < 0,05$ ), aumentando esta reactividad a la quinta semana p.i. antes de que comience la aparición del parásito en las heces.

25 Los resultados obtenidos mediante el ELISA Fag20-60 tanto en suero como en yema de huevos de gallinas infectadas experimentalmente con *A. galli* demuestran que se puede diagnosticar la parasitosis entre 13 y 20 días antes de que los huevos del parásito se puedan ver en las heces (a partir del día 41 p.i.), dependiendo del material empleado para realizar el análisis. Esto confiere un tiempo sustancial para aplicar las medidas de aislamiento o de otro tipo, necesarias para impedir la propagación de la parasitosis.

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 323 113 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma perteneciente a una especie del orden *Gallináceas* infectada por *Ascaridia galli*.

2. Fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma según la reivindicación anterior, donde los fragmentos son seleccionados del grupo que comprende:

10 a. 29-34 KDa,

b. 43-54 KDa, ó

c. 56-65 KDa.

15 3. Fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde al menos uno de los fragmentos es seleccionado de entre los 48-50 KDa.

20 4. Fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma según la reivindicación 1, donde al menos uno de los fragmentos es esencialmente de 45 KDa.

5. Fracción antigénica o fragmentos de la misma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la especie del orden *Gallináceas* es seleccionada del grupo que comprende

25 a. *Gallus gallus*, ó

b. *Meleagris gallopavo*.

30 6. Anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de interactuar con la fracción antigénica o fragmentos de la misma, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica, perteneciente a una especie del orden *Gallináceas*, que comprende los siguientes pasos:

35 a. poner en contacto la muestra aislada con la fracción antigénica o fragmentos de la misma, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

b. detectar la interacción de los anticuerpos contenidos en la muestra con la fracción antigénica o fragmentos de la misma del paso (a),

40 donde la detección positiva de la interacción es indicativa de la presencia de *Ascaridia galli* en la muestra.

8. Método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli*, según la reivindicación anterior, donde la detección de la interacción es llevada a cabo mediante un anticuerpo secundario marcado.

45 9. Método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica, perteneciente a una especie del orden *Gallináceas*, que comprende:

a. poner en contacto una muestra aislada con los anticuerpos según la reivindicación 6

50 b. detectar la interacción de los anticuerpos con la fracción antigénica o fragmentos de la misma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

donde la detección positiva de la interacción es indicativa de la presencia de *Ascaridia galli* en la muestra.

55 10. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde la especie del orden *Gallináceas* es seleccionada del grupo que comprende

60 a. *Gallus gallus*, ó

b. *Meleagris gallopavo*.

11. Método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli*, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la muestra biológica procede de huevo.

65

## ES 2 323 113 B1

12. Método *in vitro* para la detección temprana de *Ascaridia galli*, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la muestra biológica es seleccionada del grupo que comprende:

- 5
- a. Sangre,
  - b. Suero ó
  - c. heces.

10 13. Kit de detección para la detección temprana de *Ascaridia galli* en una muestra biológica, perteneciente a una especie del orden *Gallináceas*, que comprende:

- a. una fracción antigénica o fragmentos de la misma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y/o
- 15 b. anticuerpos según la reivindicación 6.

14. Kit de detección, según la reivindicación anterior, donde la especie del orden *Gallináceas* es seleccionada del grupo que comprende:

- 20
- a. *Gallus gallus*, ó
  - b. *Meleagris gallopavo*.

25 15. Uso de la fracción antigénica de 20 a 60 KDa o fragmentos de la misma, según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, para la obtención de anticuerpos específicos frente a *Ascaridia galli*.

30

35

40

45

50

55

60

65



FIG. 1.

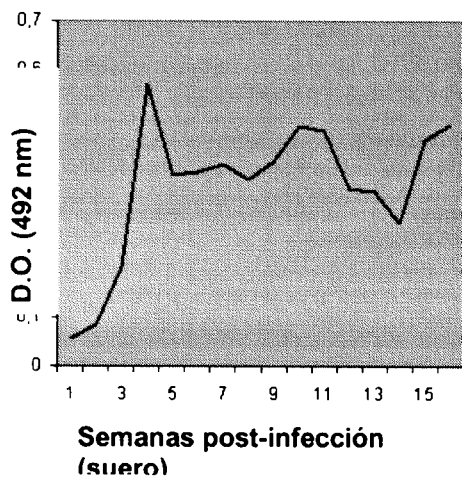


FIG.1A

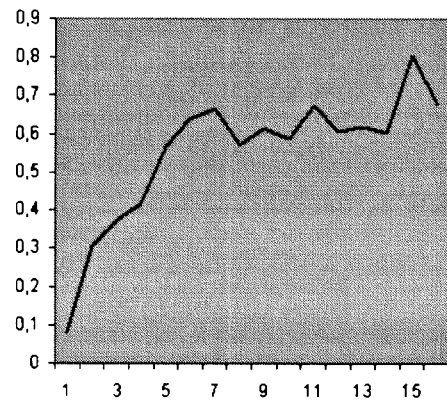


FIG.1B

FIG. 2.

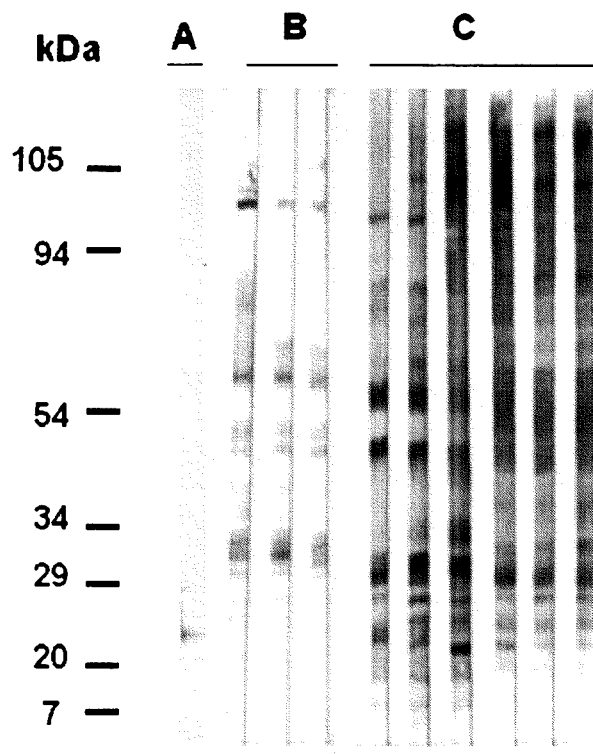


FIG. 3.

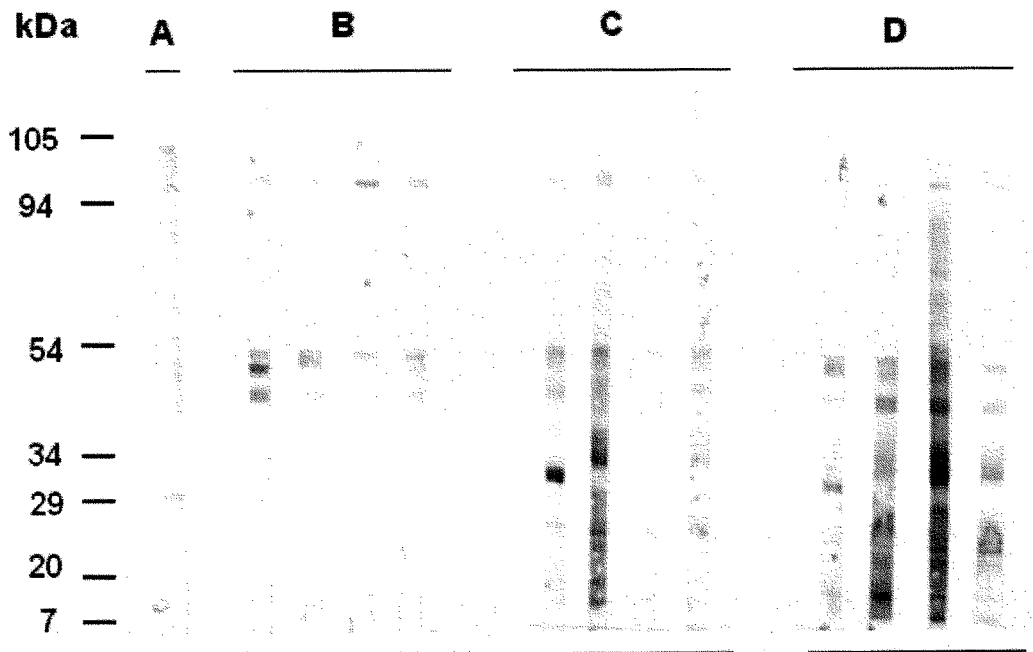


FIG. 4.

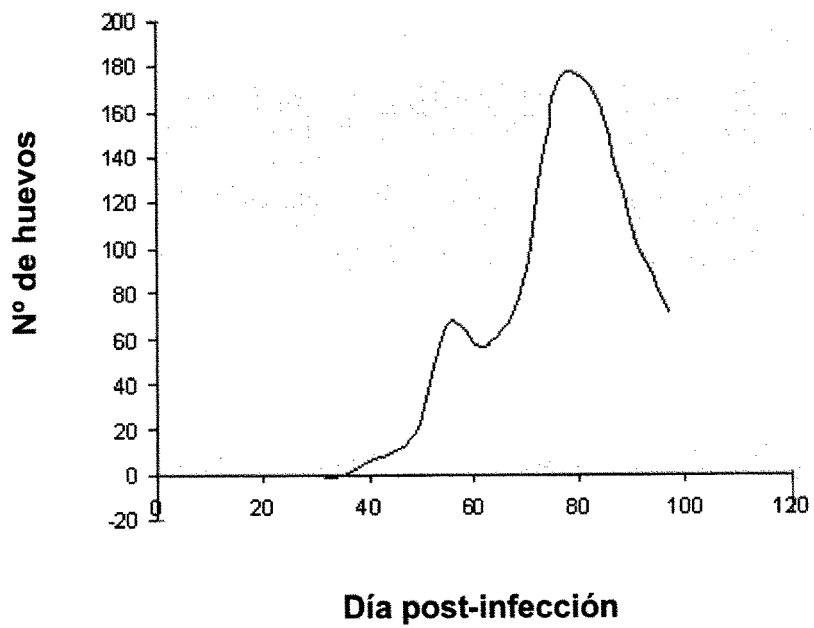
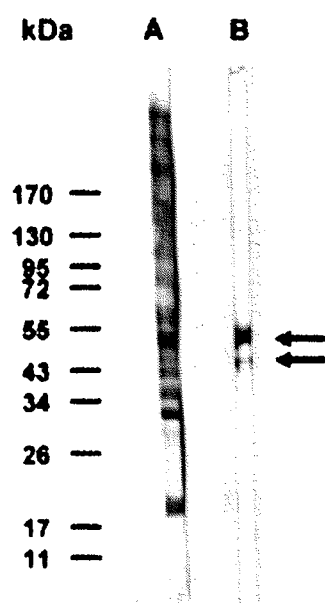


FIG. 5.

Sueros (semana)	D.O.s medias	Significación estadística.*	Yemas	D.O.s medias	Significación estadística.*
0	0.110		0	0.254	
1	0.158	No significante.	1	0.310	No significante.
2	0.228	No significante.	2	0.381	No significante.
3	1.525	Significante. p<0.005	3	0.426	No significante.
5	1.327	Significante. p<0.005	4	0.972	Significante. p<0.05
			5	1.288	Significante. p<0.005

FIG. 6.





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 113

② Nº de solicitud: 200701831

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/563** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005071415 A1 (IBERICA DE TECNOLOGIA AVICOLA, S.A.) 04.08.2005, todo el documento.	1-15
A	EMAN H. ABDEL-RAHMAN y FATHIA A.M. KHALIL, "Partial purification and characterization of Ascaridia galli diagnostic worm antigen" Journal of the Egyptian Society of Parasitology (agosto 2005) Vol. 32, Nº. 2, páginas 525-536; ISSN 1110-0583; todo el documento.	1-15
A	J.R. MARTÍN-PACHO et al., "A coprological and serological survey for the prevalence of Ascaridia spp. in laying hens" J. Vet. Med. B (junio 2005) Vol. 52, Nº. 5, páginas 238-242; ISSN 0931-1793; DOI: 10.1111/j.1439-0450.2005.00853.x; todo el documento.	1-15

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
19.06.2009

**Examinador**  
A. García Coca

**Página**  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, SNT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.06.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EMAN H. ABDEL-RAHMAN Y FATHIA A.M. KHALIL	agosto2005
D02	J.R. MARTÍN-PACHO ET EL.	01.06.2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, es una fracción antigénica de 20 a 60 KDa perteneciente a una especie (*Gallus gallus* o *Meleagris gallipavo*) del orden Gallinaceas infectada por *Ascaridia galli*. Es también objeto de la invención el uso de dicha fracción antigénica para la obtención de anticuerpos específicos frente a *Ascaridia galli* y los anticuerpos capaces de interactuar con dicha fracción antigénica. Otro aspecto de la invención son los métodos de detección temprana de *Ascaridia galli* y un kit para llevar a cabo dichos métodos.

El documento D01 divulga una fracción antigénica de 41 a 207 KDa perteneciente a un extracto a partir de una purificación parcial de un gusano completo de *A. galli*, y una fracción de 14.4 a 155 KDa de antígenos ES (excretado-secretado) a partir del contenido proteico de individuos vivos de *A. galli*. Mediante técnicas de ELISA y utilizando suero de gallinas infectadas, se evalúa el potencial de dichas fracciones antigénicas para el diagnóstico de ascaridiasis en pollos. Aunque este documento divulga fracciones antigénicas en donde quedarían incluidas las fracciones antigénicas de la solicitud, el material biológico de partida es distinto, ya que en el documento D01 se parte de individuos de *A. galli*, mientras que en la solicitud el material biológico de partida pertenece a una especie del orden Gallinaceas infectada por *A. galli*.

El documento D01 divulga la utilización de técnicas de ELISA para evaluar el potencial de las fracciones antigénicas para el diagnóstico de ascaridiasis en pollos. El método empleado en el documento D01 consiste en poner en contacto las fracciones antigénicas divulgadas, con suero de pollos infectados y detectar la interacción entre los anticuerpos del suero (IgG) con las fracciones antigénicas mediante un segundo anticuerpo (anti-IgG) (ver página 528 párrafo 5, referencia "Rokni et al. (2002)").

El documento D02 divulga un estudio para el diagnóstico temprano de ascaridiosis en gallinas, comparando los métodos de diagnóstico existentes, como la detección de huevos de *A. galli* en las heces de las gallinas o mediante la examinación post-mortem del animal infectado, frente a análisis serológicos. En este documento se divulga la posibilidad de detección de la infección por *A. galli* en sangre del animal, mediante técnicas de ELISA, y confirmando los resultados mediante Western blot. Este documento también divulga una fracción antigénica de 38 a 133 KDa obtenida a partir de complejo antigénico completo de un individuo adulto de *A. galli*, que interactúan con anticuerpos (IgG) del suero de gallinas infectadas. El método empleado en este documento consiste en poner en contacto las fracciones antigénicas divulgadas, con suero de gallinas infectados y detectar la interacción entre los anticuerpos del suero (IgG) con las fracciones antigénicas mediante un segundo anticuerpo (anti-IgG) (ver página 239, apartado "analyses"). Aunque el método empleado en los documentos D01 y D02 son el mismo del empleado en la solicitud, al limitarlo a la detección de las fracciones antigénicas descritas en la solicitud, al ser éstas nuevas, el método de detección de las mismas, es también nuevo.

En consecuencia, la invención contenida en las reivindicaciones 1-15 es nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).