

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 471**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2005** **E 10190616 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2322932**

54 Título: **Detección de la tuberculosis e infección por Mycobacterium tuberculosis utilizando HBHA**

30 Prioridad:

30.06.2004 FR 0407255

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

26.11.2014

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR DE LILLE (25.0%)

1, rue du Professeur Calme

59000 Lille , FR;

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (25.0%);**

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (25.0%) y

**UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE (LILLE
II) (25.0%)**

72 Inventor/es:

LOCHT, CAMILLE;

MASCART, FRANÇOISE;

TEMMERMAN, STÉPHANE;

HOUGARDY, JEAN-MICHEL;

PLACE, SAMMY y

SERGHERAERT, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 523 471 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

Detección de la tuberculosis e infección por *Mycobacterium tuberculosis* utilizando HBHA

- 5 La solicitud describe unos métodos para la detección *in vitro* de infección con *Mycobacterium tuberculosis* en mamíferos, y a métodos para la distinción *in vitro* entre mamíferos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* para los cuales está declarada la enfermedad (forma activa) y mamíferos infectados pero asintomáticos para tuberculosis (forma latente), y a un método para la distinción *in vitro* entre mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis y mamíferos no infectados por *M. tuberculosis* o que presentan una forma latente de tuberculosis. La
- 10 solicitud describe asimismo unos kits para detectar y distinguir entre mamíferos infectados que presentan los síntomas de la tuberculosis y mamíferos infectados que no han desarrollado la enfermedad, y un kit para distinguir entre mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis y mamíferos no infectados por *M. tuberculosis* o que presentan una forma latente de tuberculosis.
- 15 La invención se refiere a un método para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana.
- 20 La tuberculosis es una enfermedad bacteriana que afecta principalmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar); también pueden estar afectadas otras partes del cuerpo, tales como los ganglios linfáticos, la pleura (espacio pleural), las articulaciones, los huesos, el aparato genitourinario, las meninges, el peritoneo, el tubo digestivo, el sistema nervioso central, las glándulas suprarrenales, o el pericardio (tuberculosis extrapulmonar).
- 25 La tuberculosis se transmite de forma aérea, mediante exposición a gérmenes presentes en la saliva y expectoraciones pulmonares (por ejemplo cuando se tose o se estornuda) de un mamífero portador de la enfermedad, o mediante contacto con lesiones. Los síntomas de la tuberculosis son fiebre, sudores nocturnos, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, y tos persistente.
- 30 En el año 2004, la tuberculosis todavía representaba un problema de salud pública importante ya que es responsable de más de dos millones de muertes por año a nivel mundial, y un tercio de la población mundial está infectada por el agente responsable, *Mycobacterium tuberculosis*, habitualmente conocido como bacilo de Koch o KB. La tuberculosis es así la segunda causa más importante de muerte por enfermedad infecciosa, justo por detrás de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (1). Por esta razón, tanto la Organización Mundial de la Salud como la Comunidad Europea han hecho de la investigación en este campo una de sus prioridades. Se han
- 35 definido tres objetivos principales:
- a) prevención mediante el desarrollo de una vacuna que proporcionará una mejor protección que la vacuna actual, BCG (bacilo de Calmette y Guérin);
 - 40 b) mejorar los medios para el diagnóstico rápido de la tuberculosis; y
 - c) descubrir unos tratamientos más rápidos que facilitan la administración y de este modo que evitan el desarrollo de cepas bacterianas multirresistentes.
- 45 La detección inadecuada de nuevos casos de tuberculosis se ha identificado como una razón principal para el incremento a nivel mundial en el número de casos de tuberculosis (2). El examen microscópico y el cultivo de esputo son reconocidos como dos buenas rutas para diagnosticar tuberculosis pulmonar. Sin embargo, los resultados de los cultivos micobacterianos sólo se pueden interpretar después de 6 a 8 semanas, y los países en desarrollo no siempre tienen acceso a la infraestructura requerida para esta técnica, lo que limita enormemente la utilidad del
- 50 cultivo como un ensayo de diagnóstico de la primera intención (3). La determinación de bacilos acidorresistentes en esputo sigue siendo así el ensayo más útil para el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar, pero la identificación es desafortunadamente sólo positiva en 50% a 60% de casos de tuberculosis pulmonar, debido parcialmente al hecho de que se necesitan 5.000 a 10.000 bacilos por µl de esputo para que el ensayo sea positivo (3). El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es incluso más difícil en un niño que, cuando joven, raramente expectora, y del que se recoge habitualmente una aspiración gástrica. Sin embargo, el examen directo de tales muestras es
- 55 positivo en menos del 20% de niños con tuberculosis demostrada, lo que es mucho menor que los resultados obtenidos en los adultos (4). Finalmente, todavía es difícil de realizar un diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar, que es más frecuente en niños que en adultos. A menudo se basa principalmente en el examen anatomopatológico de biopsias. La aparición histológica convencional de tuberculosis es la presencia de granulomas con necrosis caseosa. El granuloma está constituido por histiocitos, células epiteloideas y/o células gigantes de tipo Langerhans. Sin embargo, tanto para muestras de ganglios linfáticos como para muestras pulmonares, un cierto número de diferentes diagnósticos se puede interpretar como infecciones (micobacterias no tuberculosas, micosis, etc.) o enfermedades no infecciosas (sarcoidosis, enfermedad de Wegener, etc.) (5). Para validar el diagnóstico de la tuberculosis, se debe de completar un examen histológico llevando a cabo tinciones especiales, tales como la
- 60 tinción de Ziehl-Nielsen, que explota las propiedades alcohol-acidorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin
- 65

embargo, para obtener una tinción de Ziehl-Nielsen positiva, es necesaria una cantidad de 10^6 organismos por mililitro de tejido (6).

Finalmente, un diagnóstico todavía se basa a menudo en un conjunto de datos clínicos o radiológicos y en los resultados de un ensayo de piel para hipersensibilidad retrasada a tuberculina (derivado proteico purificado o PPD). Sin embargo, este último ensayo no puede diferenciar fácilmente individuos infectados con *M. tuberculosis* de aquellos vacunados con BCG, y las reacciones cruzadas con micobacterias medioambientales hacen escasa su especificidad. Este ensayo, que se basa en la demostración de una respuesta inmunitaria celular, tiene una mala sensibilidad en individuos inmunodeficientes. Finalmente, aunque permite identificar personas infectadas con *M. tuberculosis* en una población de individuos no vacunados, desafortunadamente no puede diferenciar individuos que presentan una tuberculosis latente (libre de síntomas) de aquellos con una enfermedad activa. De hecho, sólo el 5% a 10% de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan una enfermedad, mientras que los otros están protegidos frente a la enfermedad incluso si están infectados (7). Entonces, el uso práctico de ese ensayo es extremadamente limitado.

Más recientemente, se han desarrollado técnicas de biología molecular para demostrar la presencia de *M. tuberculosis* usando técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Tales técnicas son sensibles (95%), pero esto es especialmente cierto para muestras de esputo para las cuales el examen directo es positivo. Por el contrario, su especificidad es excelente (98%), lo que permite que *M. tuberculosis* se distinga de otras micobacterias. Sin embargo, la técnica es cara, limitando su aplicación.

Parece de este modo que es una cuestión urgente desarrollar nuevos medios para diagnosticar rápidamente la tuberculosis. Uno de los posibles enfoques consiste en explotar las diferencias en respuestas inmunitarias que pueden existir entre sujetos no infectados e individuos infectados, dependiendo de si están o no enfermos. De este modo, en la bibliografía se han dado a conocer diferentes ensayos, que se basan en un estudio de la secreción inducida de IFN- γ en linfocitos circulantes mediante antígenos micobacterianos (8). Un análisis de la secreción de IFN- γ inducida por tuberculina, una mezcla compleja de antígenos micobacterianos, sin embargo, tiene las mismas limitaciones como su uso para los ensayos de piel. De hecho, responderán todos los individuos sensibilizados, ya sea que estén enfermos o no, y las personas sensibilizadas a los antígenos presentes en ciertas micobacterias atípicas o simplemente en BCG. La ventaja de este ensayo con respecto a los ensayos de piel es que un análisis de la respuesta linfocitaria en paralelo con un control positivo (fitohemaglutinina) puede detectar pacientes que no responden a PPD debido a inmunodeficiencia grave. Se aislaron entonces antígenos específicos para *M. tuberculosis* y se usaron en ensayos de secreción de IFN- γ *in vitro*, y la especificidad de dichos ensayos fue claramente muy superior. Esencialmente, se pueden usar los antígenos ESAT-6 y CFP 10, pero se debería señalar que la discriminación obtenida por esos antígenos entre sujetos infectados enfermos o sanos está muy lejos de ser perfecta (9).

Un estudio de respuestas inmunitarias en seres humanos con relación a "hemaglutinina de unión a heparina" (HBHA) muestra una discriminación excelente entre personas infectadas enfermas y sanas. La HBHA es una adhesión, expresada en la superficie de bacterias que forman parte del complejo de *Mycobacterium*, y no en la superficie de bacterias no patógenas tales como *M. smegmatis* (10). Esta proteína es segregada por *M. tuberculosis* y es responsable de la diseminación de la infección (11). HBHA tiene una región C-terminal metilada y se expresa en la superficie, mientras que la porción N-terminal no metilada se ancla a la adhesina en la pared micobacteriana (12). La metilación es importante, no sólo para inducir respuestas inmunitarias en seres humanos, sino también para inducir una respuesta inmunitaria protectora en el ratón (13). Se ha mostrado que la secreción inducida de IFN- γ en linfocitos circulantes mediante la estimulación *in vitro* con HBHA difiere dependiendo de si las personas infectadas con *M. tuberculosis* estaban enfermas o no (14). Mientras que IFN- γ es segregado por los linfocitos periféricos en la mayoría de pacientes sanos en respuesta a HBHA, sólo una minoría de pacientes tuberculosos respondió a ese antígeno segregando IFN- γ . Sin embargo, la discriminación entre estos dos grupos de individuos sobre la base de estos resultados preliminares fue insuficiente para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico.

Li et al., 1999 (Infection and Immunity, páginas 4780-4786) se refieren a la inmunogenicidad de vacunas de ADN que expresan proteínas de tuberculosis fusionadas a secuencias señal del activador de plasminógeno tisular.

Lalvani et al. 2001 (The Journal of Infectious Diseases 183: 469-477) se refieren a la enumeración de células T específicas para antígenos codificados por RD1, y a la infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* en indios urbanos sanos.

La solicitud pretende proporcionar métodos para la detección *in vitro* de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en mamíferos.

La solicitud describe unos métodos para la distinción *in vitro* entre mamíferos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* en los que la enfermedad está declarada y mamíferos infectados pero que no desarrollan tuberculosis, un método para la identificación *in vitro* de pacientes con TB latente en una población sana, y un método para la

distinción *in vitro* entre mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis y mamíferos no infectados por *M. tuberculosis* o que presentan una forma latente de tuberculosis.

5 La invención se refiere a un método para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana.

10 Finalmente, la solicitud también describe kits que contienen todos los elementos necesarios para detectar infección por *Mycobacterium tuberculosis* y que pueden distinguir pacientes infectados que expresan la enfermedad (tuberculosis activa) de pacientes infectados y asintomáticos (tuberculosis latente), y un kit para distinguir entre mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis y mamíferos no infectados por *M. tuberculosis* o que presentan una forma latente de tuberculosis.

15 La solicitud también describe el uso de HBHA en su forma nativa o recombinante en un ensayo para detectar infección por *Mycobacterium tuberculosis* y para distinguir entre pacientes que presentan una forma latente de tuberculosis y pacientes que presentan todos los síntomas de tuberculosis y que están enfermos. Estos y otros objetivos se describen en la solicitud, como se demostrará en el sumario de la solicitud y de la invención, la descripción y las implementaciones preferidas así como las reivindicaciones.

20 Sumario de la solicitud y de la invención

25 La solicitud describe un método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, comprendiendo dicho método a) obtener una muestra biológica de dicho mamífero; b) medir la cantidad de anticuerpos (IgG) dirigidos contra dos formas distintas de la proteína HBHA, y contenidos en dicha muestra biológica; y c) comparar los títulos de anticuerpo obtenidos para las dos formas de la proteína HBHA, en el que la comparación de los títulos de anticuerpo obtenidos para las dos formas distintas en el mamífero que presenta una tuberculosis latente es diferente de los obtenidos en el mamífero que presenta una tuberculosis activa.

30 La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, comprendiendo dicho kit dos formas distintas de HBHA seleccionadas de entre el grupo que consiste en a) HBHA nativa y HBHA recombinante, o b) el fragmento rHBHA Δ C y el fragmento C-terminal metilado de HBHA, los reactivos requeridos para constituir un medio para llevar a cabo la reacción inmunológica entre los anticuerpos contenidos en la muestra biológica procedente de dicho mamífero y las formas distintas de HBHA, y los reactivos que permiten la detección de complejos inmunológicos formados durante dicha reacción inmunológica.

40 La solicitud también describe un método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho método a) obtener una muestra biológica procedente de dicho mamífero; b) poner en contacto dicha muestra biológica, de una manera independiente, con la forma nativa de HBHA y con ESAT-6; c) medir la secreción de IFN- γ específica de HBHA y la secreción de IFN- γ específica de ESAT-6; y d) calcular la relación entre la secreción de IFN- γ específica de HBHA y la secreción de IFN- γ específica de ESAT-6, en el que dicha relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis latente es mayor que la relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis activa u obtenida en un mamífero no infectado por *M. tuberculosis*.

50 La invención se refiere a un método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho método

55 a) poner en contacto, de una manera independiente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de dicho mamífero con la forma nativa de adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) y con la diana 6 antigénica secretora temprana (ESAT-6) en condiciones que permiten la secreción de IFN- γ ;

b) medir la concentración de IFN- γ específico de HBHA y la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6 mediante ELISA; y

60 c) calcular la relación de la concentración de IFN- γ específico de HBHA a la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6, en el que dicha relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis latente es mayor que 1, mientras que la relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis activa es menor que 1.

65 La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente de un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una

tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho kit la forma nativa de HBHA y ESAT-6, los reactivos requeridos para constituir un medio para llevar a cabo el contacto, de una manera independiente, de las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA y ESAT-6 nativas, y reactivos para detectar la secreción de IFN- γ después del contacto.

La solicitud también describe un método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis activa y un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o una tuberculosis latente, comprendiendo dicho método a) obtener una muestra biológica de sitios de infección local de dicho mamífero; b) poner en contacto dicha muestra biológica con la forma nativa o recombinante de HBHA; y c) medir el efecto de dicho contacto sobre IFN- γ específico de HBHA, en el que el efecto del IFN- γ específico de HBHA es mayor en un mamífero que presenta una tuberculosis activa que en un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente.

La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis activa de un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente, comprendiendo dicho kit la forma nativa o recombinante de HBHA, los reactivos requeridos para constituir un medio adecuado para llevar a cabo el contacto de las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA, y los reactivos que permiten la detección de IFN- γ tras el contacto.

Descripción de las figuras

La figura 1 se refiere a títulos de IgG específico de HBHA en pacientes tuberculosos (TB) y en sujetos que presentan una tuberculosis latente (PI). Los rectángulos muestran los percentiles 25° y 75°. Las líneas verticales muestran los valores máximos. No se observa diferencia significativa entre estas dos poblaciones ($p > 0,05$).

La figura 2 compara los títulos de IgG específico de nHBHA frente a IgG específico de rHBHA en pacientes tuberculosos (TB) y en sujetos que presentan una forma latente de tuberculosis (PI).

La figura 2A muestra que, en sujetos que presentan una tuberculosis latente, el IgG reconoce la forma metilada nativa de HBHA mejor que la forma recombinante (rHBHA) ($p = 0,0015$), mientras que en pacientes tuberculosos (Figura 2B) esta diferencia no es significativa ($p > 0,05$).

La figura 3 compara los títulos de IgG específico de rHBHA Δ C frente al fragmento C de IgG específico de HBHA (péptido C) en paciente tuberculosos (TB) y en sujetos que presentan una forma latente de tuberculosis (PI).

La figura 3A muestra que los pacientes tuberculosos tienen IgG que reconoce preferentemente la forma recombinante troncada (rHBHA Δ C), mientras que el IgG de sujetos que presentan una tuberculosis latente apenas reconoce esta forma ($p = 0,0052$). Por el contrario, en la figura 3B, el IgG de pacientes tuberculosos no reconoce el fragmento del péptido C, en contraste con los sujetos que presentan una tuberculosis latente ($p = 0,0478$).

La figura 4 muestra la secreción de IFN- γ en respuesta a nHBHA en sujetos de control (ctrl; $n = 12$), en sujetos que presentan una tuberculosis latente reciente (< 5 años) (PI; $n = 38$) y en pacientes tuberculosos (TB; $n = 46$). Las medianas están respectivamente a 10 pg/ml, 2040 pg/ml y 16 pg/ml. ** $p < 0.001$.

La figura 5 muestra la secreción de IFN- γ en respuesta a ESAT-6 en sujetos con una tuberculosis latente (PI) y pacientes tuberculosos (TB).

En sujetos que presentan una tuberculosis latente, la secreción de IFN- γ inducida por ESAT-6 específica es significativamente menor que la inducida en pacientes tuberculosos. Las medianas están a 42,50 pg/ml de IFN- γ para ESAT-6 en pacientes PI, y 4072 pg/ml de IFN- γ en pacientes TB ($p = 0,02$).

La figura 6 muestra la relación nHBHA/ESAT-6 en pacientes con tuberculosis y en sujetos que presentan una tuberculosis latente. Las medianas son respectivamente 0,1 pg/ml y 146,2 pg/ml. Esta relación está sustancialmente a favor de sujetos que presentan una tuberculosis latente ($p = 0,001$), y ofrece buena discriminación entre sujetos infectados enfermos y aquellos infectados no enfermos (libres de síntomas).

La figura 7 muestra el efecto del factor de crecimiento anti-transformante beta 1, 2, 3 (anticuerpos de bloqueo anti-TGF(3)) sobre la secreción de IFN- γ en respuesta a nHBHA por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en pacientes tuberculosos. El IFN- γ se ensayó en sobrenadantes de cultivo. Prueba de pares (Wilcoxon - $p = 0,0161$; $n = 15$ pares).

La figura 8 muestra una comparación entre la secreción de IFN- γ en respuesta a nHBHA y a PPD por células mononucleares de fluido pleural retiradas de pacientes que presentan una efusión pleural de origen

tuberculoso o de otro origen. El IFN- γ se ensayó en sobrenadantes de cultivo. Las líneas horizontales representan las medianas.

La figura 9 ilustra la proporción de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ de PBMC (PBMC nHBHA) en comparación con linfocitos T CD3⁺CD4⁺ pleurales (linfo. pleurales nHBHA) y que contienen IFN- γ intracitoplásmico en respuesta a nHBHA, expresada como un porcentaje de células que expresan IFN- γ tras la estimulación mediante HBHA durante 16 horas menos el porcentaje de células que producen IFN- γ sin estimulación mediante HBHA en pacientes tuberculosos (n = 7). Las medianas están situadas respectivamente a 0,04% y 1,23% (p = 0,0156; Wilcoxon).

La figura 10 representa la proporción de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ que contienen IFN- γ intracitoplásmico en respuesta a nHBHA en el caso de tuberculosis pleural (n = 7; mediana = 1,23%) y en el caso de efusiones pleurales de origen no tuberculoso (n = 2; mediana = 0,18%).

La figura 11 muestra la proporción de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ (Figura 11A) y de CD3⁺CD8⁺ (figura 11B) que contienen IFN- γ en respuesta a la estimulación mediante nHBHA.

La figura muestra células linfocíticas alveolares (alvéolos) procedentes de fluido de lavado broncoalveolar, o células de mononucleares de sangre periférica (sangre).

El fluido de lavado broncoalveolar se obtuvo de pacientes que presentan una tuberculosis pulmonar (TB) o de sujetos de control que presentan una lesión pulmonar de origen no tuberculoso.

La figura 12 muestra curvas ROC que permiten la discriminación entre pacientes TB latente e individuos de control de la secreción de IFN- γ específica de nHBHA (A), la discriminación entre pacientes con TB latente y con TB activa de la secreción de IFN- γ específica de nHBHA (B) y la discriminación entre TB latente y TB activa de la secreción de IFN- γ específica de PPD (C).

independientemente de las figuras descritas anteriormente, NS indica que las diferencias no son significativas, * indica que las diferencias son significativas con $0,01 < p < 0,05$, y ** indica que las diferencias son fuertemente significativas, con $p < 0,01$.

Descripción de las formas de realización preferidas

En el contexto de la solicitud o invención, el término "mamífero" designa cualquier animal de sangre caliente cubierto con pelo o pelaje, que amamanta a sus jóvenes y los pare. El término "mamífero" comprende de manera no limitativa seres humanos, elefantes, cerdos, perros, gatos, ganado, cérvidos, monos, etc.

Aunque *Mycobacterium tuberculosis* infecta principalmente a un hospedante humano, otros mamíferos también pueden estar afectados por esta enfermedad bacteriana. En este caso, la infección con tuberculosis en mamíferos distintos del hombre es conocida como "zoonosis inversa", puesto que *Mycobacterium tuberculosis* se puede transmitir del hombre a un animal.

La abreviatura "HBHA" significa "adhesina hemaglutinina de unión a heparina", y es una proteína de la superficie implicada en la adhesión a células epiteliales (números de acceso Genbank AF074390 y AAC26052.1). La identificación de la proteína HBHA en su forma nativa se ha descrito por Menzozzi et al (J Exp Med 184; 993-1001 (1996)). La HBHA es una proteína de 199 aminoácidos, cuya porción C terminal es rica en repeticiones de lisina y contiene el sitio de unión a heparina. Esta proteína es necesaria para la diseminación extrapulmonar de *Mycobacterium tuberculosis* (Pethe et al, Nature 412: 190-194 (2001)).

La HBHA recombinante (rHBHA) se describe en la solicitud de patente francesa FR-A-01/14953, que da a conocer que, en contraste con la proteína HBHA nativa (nHBHA), la proteína HBHA recombinante no está metilada en sus restos de lisina en la porción C terminal.

El fragmento rHBHA Δ C se describe en Pethe et al (2000, Journal of Biological Chemistry 275 (19): 14273-14280). Este fragmento deriva de HBHA recombinante, para el cual se han suprimido los aminoácidos 161-199.

El fragmento C terminal metilado comprende los aminoácidos 161-199 con la siguiente secuencia:

KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAKKAPAKKAAKKVTQK (SEC ID NO: 1)

En el contexto de la solicitud o invención, la abreviatura "PBMC" significa "células mononucleares de sangre periférica". Las PBMC descritas en la presente memoria se pueden obtener mediante cualquier método conocido en la bibliografía. En una puesta en práctica de la solicitud o invención, las PBMC se obtienen centrifugando en gradiente de densidad a partir de muestras de sangre venosa usando una disolución de aproximadamente 9,1%

(p/v) de diatriazoato de sodio y una disolución de aproximadamente 5,7% de polisacárido. Esta disolución tiene una densidad de aproximadamente $1,077 \pm 0,001$ g/ml y una osmolalidad de 280 ± 15 mOsm. Esta disolución tiene el nombre comercial Lymphoprep™.

Las expresiones “tuberculosis latente” o “*Mycobacterium tuberculosis* latente” o “forma latente de tuberculosis” se usa de forma intercambiable en la solicitud o invención, y significan que el mamífero está infectado por la bacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* pero es asintomático, es decir, no desarrolla síntomas de tuberculosis. Además, el mamífero infectado no puede propagar la tuberculosis a otros mamíferos, puesto que no hay gérmenes de tuberculosis en el esputo. En otras palabras, el mamífero está infectado pero no desarrolla la enfermedad.

Las diversas formas de tuberculosis se clasifican según lo siguiente:

TB0: sin exposición al agente de tuberculosis; sin infección;

TB1: exposición a *Mycobacterium tuberculosis*, grado desconocido de infección;

TB2: infección por agente de tuberculosis, sin desarrollo de síntomas (reacción positiva a la prueba de piel de tuberculina: PPD positivo)

TB3: forma activa de tuberculosis, diagnóstico completo;

TB4: forma clínicamente inactiva de tuberculosis, tratada adecuadamente o en remisión; y

TB5: posible tuberculosis, diagnóstico en cadena (“descartar” TB).

La expresión “población sana”, dentro del contexto de la solicitud o invención, se refiere a individuos que no desarrollan síntomas de tuberculosis, cualquiera que sea su estado de infección, es decir, no infectados (TB0) o infectados pero sanos (tuberculosis latente; TB2).

Los métodos y kits descritos en el contexto de la solicitud o invención pueden distinguir la forma TB3 de la forma TB2, la forma TB2 de la forma TB0, y la forma TB3 de la forma TB0 en la clasificación anterior.

La abreviatura PPD significa “derivado purificado de proteína tuberculina”. La tuberculosis se diagnostica habitualmente mediante una prueba que implica la exposición intracutánea a PPD. Esta prueba se considera que es positiva para tuberculosis si la reacción de la piel en el punto de exposición a PPD está por encima de un cierto tamaño, por ejemplo 10 mm o más.

La expresión “muestra biológica”, como se define en la presente memoria, comprende muestras respiratorias y no respiratorias. Las muestras respiratorias incluyen aspiraciones bronquiales, lavados broncoalveolares (BAL), lavado gástrico y esputo. Los ejemplos de muestras no respiratorias que se pueden usar en los métodos de la solicitud o invención incluyen muestras de fluidos de efusión tales como fluidos pleurales, abdominales y articulares, fluidos cerebroespinales, fluidos cefalorraquídeos, fluidos sinoviales, fluidos peritoneales, fluidos pericardíacos, y otros fluidos corporales, ganglios linfáticos, biopsias transbronquiales, pleurales y hepáticas, punciones medulares y lumbares, muestras de orina o de sangre (PBMC o células mononucleares de sangre periférica), aspiraciones de pus, etc.

La expresión “del sitio de infección” comprende cualquier muestra biológica retirada de un sitio de infección por tuberculosis, y comprende cualquiera de las muestras biológicas mencionadas anteriormente, y otras.

Los métodos de la solicitud pueden por un lado detectar *in vitro* una respuesta inmunitaria, en el mamífero infectado, a la proteína HBHA de *Mycobacterium tuberculosis*, un signo de infección por dicho agente patógeno, y por otro lado distinguir *in vitro*, opcionalmente complementarios a los métodos de diagnóstico existentes, la forma latente de la forma activa de tuberculosis, en otras palabras, las formas no infecciosas de las infecciosas respectivamente.

La solicitud describe un método *in vitro* para detectar y diferenciar en un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, comprendiendo dicho método

a) obtener una muestra biológica de dicho mamífero;

b) medir la cantidad de anticuerpos (IgG) dirigidos contra dos formas distintas de la proteína HBHA, y contenidos en dicha muestra biológica, en condiciones adecuadas para la formación de una interacción anticuerpo-HBHA; y

c) comparar los títulos de anticuerpo obtenidos para las dos formas de la proteína HBHA,

en el que la comparación de los títulos de anticuerpo obtenidos para las dos formas distintas en el mamífero que presenta una tuberculosis latente es diferente de los obtenidos en el mamífero que presenta una tuberculosis activa.

Partiendo de una muestra biológica procedente de un mamífero y usando las características de las respuestas inmunitarias dirigidas contra la proteína HBHA de *Mycobacterium tuberculosis*, que son específicas para las diferentes formas de tuberculosis (activa frente a latente), este método puede distinguir entre mamíferos infectados, aquellos que están enfermos y aquellos que no lo están. De este modo, los mamíferos que presentan una forma latente de tuberculosis y aquellos que presentan una forma activa de tuberculosis tienen respuestas inmunitarias, en particular una respuesta humoral, que difieren con respecto a la proteína HBHA.

Los anticuerpos tales como inmunoglobulinas G (IgG) que derivan de mamíferos que presentan una forma latente de tuberculosis y aquellos que presentan una forma activa de tuberculosis reconocen porciones distintas de la proteína HBHA. De este modo, es posible modular la estructura de la proteína HBHA para obtener formas distintas de HBHA y distinguir las formas diferentes de tuberculosis. La expresión "forma distinta de HBHA" significa cualquier modificación a la estructura de la proteína HBHA con respecto al número (supresión o adición) y/o la naturaleza (sustitución de aminoácidos, con tamaño, carga, impedimento estérico diferentes o idénticos) de sus restos de aminoácidos, y/o cualquier modificación post-traducciona tal como acetilación, amidación, biotilación, carboxilación, hidroxilación, metilación, fosforilación o sulfatación, o añadiendo lípidos (isoprenilación, palmitoilación y miristoilación), glúcidos (glicosilación) o polipéptidos (ubiquitinación). En el contexto de la solicitud, las dos formas se denominan distintas cuando son reconocidas en diferentes maneras por anticuerpos de mamíferos que presentan una forma latente y anticuerpos de mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis.

La titulación, es decir, la determinación de la cantidad de anticuerpos (ensayos serológicos) que reconocen a cada forma de HBHA, se lleva a cabo de manera independiente, usando cualquier técnica que es conocida por el experto en la materia, tal como ELISA directo o indirecto (ensayo inmunosorbente enlazado a enzima) o mediante radioinmunoensayo (RIA), que permite el contacto de los anticuerpos contenidos en la muestra biológica con las distintas formas de HBHA. "De una manera independiente" significa que una parte de la muestra se pone en contacto con una forma de la proteína HBHA, y otra parte de la muestra se pone en contacto con una segunda forma de la proteína HBHA. El contacto entre los anticuerpos presentes en la muestra y las formas de HBHA permitiendo su interacción y la detección de dicha interacción se lleva a cabo en unas condiciones apropiadas que son conocidas por el experto en la materia. De este modo, como ejemplo, se puede modificar lo siguiente: la técnica para acoplar el antígeno (HBHA) al soporte, las diluciones de las muestras biológicas, las concentraciones de las distintas formas de HBHA, la temperatura y el período de contacto y, si es necesario, la naturaleza y concentración de anticuerpos secundarios, así como los parámetros que permiten la detección de la interacción, tal como una reducción en el ruido de fondo, la elección de marcaje (radioactividad, fluorocromo), o el tiempo de adquisición para la señal de detección.

Como un ejemplo de un protocolo de ELISA, las formas distintas de HBHA se diluyen en un tampón adecuado (revestimiento) en una concentración en el intervalo 1 a 10 µg/ml, y se incuban (50 a 200 µl) en pocillos de microplacas durante 1 a 6 horas a temperatura ambiente (RT) o toda la noche a 4°C. Las disoluciones tamponadas usadas habitualmente son carbonato de sodio 50 mM, pH 6,9; Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, o PBS 10 mM, pH 7,2-7,4. La placa se lava entonces con una disolución de lavado (200 a 300 µl) que comprende PBS o TBS 0,1 M, pH 7,4, con un detergente tal como Triton o Tween 20 (concentración final 0,01% a 0,05%). Entonces se aplica una disolución de saturación (200 a 300 µl), tal como PBS que contiene polvo de leche desnatada, caseína o gelatina, para bloquear las interacciones no específicas, durante 30 a 60 minutos a 37°C o a temperatura ambiente, después se elimina el exceso tras varios lavados. La muestra biológica diluida (1/10 a 1/1000) (100 a 200 µl) se incuba durante 30 minutos a 2 horas a 37°C o a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, seguido de varios lavados. Entonces se añaden los anticuerpos secundarios (aproximadamente 100 µl) diluidos en la disolución de saturación durante 30 minutos a 2 h, a temperatura ambiente o a 37°C. El exceso se elimina después de varios lavados. Si es necesario, se añade un sustrato (100 µl) durante 1 a 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, seguido de una disolución de parada.

Los resultados de las valoraciones permiten comparar para el mismo mamífero los dos valores obtenidos para las dos formas distintas. Tales comparaciones llevadas a cabo simultáneamente en uno o más mamíferos que presentan una forma latente de tuberculosis y en uno o más mamíferos que presentan una forma activa de tuberculosis producen resultados muy diferentes debido al comportamiento específico de la respuesta inmunitaria que se produce en los mamíferos infectados.

Se ha mostrado previamente en la patente francesa (FR-A-01/14953) que la proteína HBHA nativa (nHBHA) está metilada en sus restos de silina en la porción C terminal. Por el contrario, la proteína HBHA recombinante (rHBHA) tiene un grado diferente de metilación puesto que no posee tales modificaciones postraduccionales.

El uso de formas nativas y recombinantes ha mostrado así que muestras biológicas procedentes de mamíferos que tienen una forma activa de tuberculosis contienen una cantidad comparable de anticuerpos dirigidos contra las formas activas y recombinantes, mostrando así que en esos mamíferos se reconoce la misma porción de la proteína

(el extremo N terminal). Por el contrario, las muestras biológicas procedentes de mamíferos que presentan una forma latente de tuberculosis muestran un título de anticuerpos dirigidos contra la forma nativa que es mayor que el título de anticuerpos dirigidos contra la forma recombinante, indicando que, en esos mamíferos, hay un reconocimiento preferente de la forma nativa metilada. Estos resultados permiten así distinguir a las formas latente y activa de tuberculosis mediante comparación de los títulos de anticuerpos dirigidos contra las formas nativas y recombinantes de HBHA.

Otras dos formas distintas de HBHA usadas en el contexto de la solicitud son el fragmento rHBHA Δ C que representa la porción N terminal de la proteína (aminoácidos 1 a 160), y una porción C terminal metilada. Una comparación de los títulos de anticuerpos derivados de la muestra biológica ha revelado que, en mamíferos que presentan una forma latente de tuberculosis, se observa un predominio de anticuerpos que reconocen el fragmento C terminal metilado, mientras que en mamíferos con una forma activa de tuberculosis, se observa un predominio de anticuerpos que reconocen el fragmento rHBHA Δ C.

Tal método que comprende la titulación de anticuerpos se puede llevar a cabo en cualquier muestra biológica que contenga IgGs. En un aspecto adicional de la solicitud, dicho método se lleva a cabo en muestras de sangre.

La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, comprendiendo dicho kit:

- dos formas distintas de HBHA, como se definen anteriormente, por un lado HBHA nativa y HBHA recombinante, y por otro lado el fragmento rHBHA Δ C y el fragmento C terminal metilado de HBHA;
- unos reactivos para constituir un medio adecuado para llevar a cabo una reacción inmunológica entre los anticuerpos contenidos en la muestra biológica procedente de dicho mamífero y las distintas formas de HBHA; dichos reactivos engloban todos los compuestos necesarios para las interacciones entre el anticuerpo y las distintas formas de HBHA, así como cualquier compuesto que puede incrementar o mejorar dichas interacciones o hacerlas más específicas;
- unos reactivos que permiten la detección de complejos inmunológicos formados durante dicha reacción inmunológica. Dichos reactivos comprenden cualquier compuesto que puede revelar o detectar la reacción entre el anticuerpo y las distintas formas de HBHA mencionadas anteriormente. Los reactivos incluyen anticuerpos secundarios, opcionalmente marcados radioactivamente o acoplados con fluorocromos, así como cualquier molécula, que pueda intensificar o modular la señal de detección.

El kit comprende opcionalmente uno o más tejidos de referencia o muestras biológicas que se pueden usar como control negativo (muestra que deriva de un mamífero no infectado; etapa TB0) o como un control positivo (etapas TB2 y/o TB3).

Los métodos convencionales, basados en la secreción de IFN- γ específica de HBHA, parecen actualmente suficientes para identificar pacientes latentes con TB en una población de control sana, así como para discriminar entre pacientes latentes con TB y pacientes activos con TB, como se muestra en las curvas ROC de la Figura 12. Sin embargo, estos métodos se pueden mejorar enormemente teniendo en cuenta la secreción de IFN- γ específica de ESAT-6. Por lo tanto, la solicitud e invención se refieren a un método alternativo a estos métodos convencionales, que se basa en secreciones de IFN- γ tanto específicas de HBHA como específicas de ESAT-6.

La solicitud describe un segundo método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho método

- a) obtener una muestra biológica de dicho mamífero;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica, de una manera independiente, con la forma nativa de HBHA y con ESAT-6 en condiciones que permiten la secreción de IFN- γ ;
- c) medir la secreción de IFN- γ específica de HBHA y la secreción de IFN- γ específica de ESAT-6; y
- d) calcular la relación entre la secreción de IFN- γ específica de HBHA y la secreción de IFN- γ específica de ESAT-6,

en el que dicha relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis latente es mayor que la relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o la obtenida en un mamífero no infectado por *M tuberculosis*.

La invención se refiere más particularmente a un método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho método

a) poner en contacto, de una manera independiente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de dicho mamífero con la forma nativa de adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) y con la diana 6 antigénica secretora temprana (ESAT-6) en condiciones que permiten la secreción de IFN- γ ,

b) medir la concentración de IFN- γ específico de HBHA y la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6 mediante ELISA; y

c) calcular la relación de la concentración de IFN- γ específico de HBHA a la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6, en el que dicha relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis latente es mayor que 1, mientras que la relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis activa es menor que 1.

En la etapa a), la muestra biológica se obtiene a partir de una población sana, es decir, a partir de individuos que no presentan síntomas de tuberculosis, o a partir de una población infectada por *M. tuberculosis*. El objetivo del método en una población sana es identificar individuos infectados por *M. tuberculosis* pero que no presentan síntomas (TB latente) entre individuos que no tienen síntomas de tuberculosis. Por el contrario, el objetivo del método en una población de pacientes infectados es discriminar entre pacientes que tienen una forma activa de tuberculosis y pacientes que tienen una forma latente de tuberculosis.

Este método comprende poner en contacto una muestra biológica con la forma nativa de HBHA, e independientemente con ESAT-6 (diana 6 antigénica segregada temprana). La expresión "de una manera independiente" significa que la muestra se pone en contacto con HBHA y, separadamente en el espacio, en contacto con ESAT-6. La adición de estas dos moléculas a la muestra biológica estimulará las células presentes en dicha muestra, y provocará la secreción de citocinas tales como IFN- γ .

La puesta en contacto de la muestra con HBHA y con ESAT-6 se lleva a cabo en condiciones que permitirán la secreción de IFN- γ . Por tanto, la elección del medio, el pH y la temperatura del medio para el contacto, el período de contacto, la dilución de la muestra biológica, las concentraciones de proteínas HBHA, se pueden modificar por un experto como una función de la naturaleza de la muestra.

La secreción de IFN- γ se mide usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia, tal como ELISA, ELISPOT, citometría de flujo (FACS), RT-PCR cuantitativa, tras el contacto de la muestra con HBHA, respectivamente denominado IFN- γ específico de HBHA, y aquella tras el contacto de la muestra con ESAT-6, denominado IFN- γ específico de ESAT-6. Las modificaciones se pueden hacer por el experto en la materia con respecto a los parámetros que pueden permitir la detección de la secreción de IFN- γ , tales como los anticuerpos, su marcaje y las condiciones de interacción. Las condiciones de ELISA son las mismas que las descritas anteriormente, conteniendo la disolución tamponada un anticuerpo anti-IFN- γ en lugar de proteínas distintas de HBHA. También se usa un anticuerpo secundario dirigido contra IFN- γ .

El cálculo de la relación entre el IFN- γ específico de HBHA y el IFN- γ específico de ESAT-6 permite distinguir la forma latente de la forma activa de tuberculosis. Por tanto, en mamíferos con la forma latente, se obtiene una relación muy elevada, de más de 1, más de 50, más de 100, más de 200, o más de 300. De este modo, una relación en intervalo 100 a 400 confirma la forma latente de tuberculosis. Por el contrario, en mamíferos con la forma activa o en mamíferos no infectados por *M. tuberculosis*, esta relación es muy baja y menor que 1, menor que 0,75, o menor que 0,5. Por tanto, una relación de cero o menor que 0,5 confirma un paciente con una forma activa de TB en un grupo de pacientes infectados por *M. tuberculosis* (por ejemplo que tienen una prueba de tuberculina positiva) o un paciente no infectado por *M. tuberculosis* en una población sana (libre de síntomas de la tuberculosis).

Este segundo método se lleva a cabo en cualquier muestra biológica usada habitualmente en el diagnóstico de la tuberculosis, tal como aspiraciones bronquiales, lavados broncoalveolares (BAL), lavados gástricos, esputo, muestras de fluidos de efusión tales como fluidos pleurales, abdominales y articulares, fluidos cerebroespinales, fluidos cefalorraquídeos, fluidos sinoviales, fluidos peritoneales, fluidos pericardíacos y otros fluidos corporales, biopsias de ganglios linfáticos, biopsias transbronquiales, biopsias pleurales y hepáticas, punciones medulares y lumbares, muestras de orina o sangre, y aspiraciones de pus. En una puesta en práctica de la solicitud o invención, este método se llevará a cabo con linfocitos extraídos mediante cualquier método conocido por el experto en la materia a partir de la toma de muestras de sangre. En una puesta en práctica adicional, las PBMCs se extraen de sangre periférica.

En una puesta en práctica adicional, después de obtener la muestra biológica y antes de la puesta en contacto de dicha muestra, el método descrito anteriormente comprende una etapa suplementaria de cultivar la muestra biológica. El cultivo se adaptará a la naturaleza de la muestra biológica.

La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho kit:

- la forma nativa de HBHA y ESAT-6;
- unos reactivos para constituir un medio para llevar a cabo el contacto, de una manera independiente, de las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA y ESAT-6 nativas; los reactivos incluyen los descritos anteriormente para el kit precedente;
- unos reactivos para detectar la secreción de IFN- γ tras el contacto. El IFN- γ segregado se medirá usando cualquier técnica conocida, y se pueden incluir en el kit anticuerpos primarios específicos para IFN- γ , opcionalmente marcados, o anticuerpos secundarios, opcionalmente marcados, capaces de reconocer el anticuerpo primario, así como cualquier molécula que pueda amplificar o modular la señal de detección.

Opcionalmente, el kit también puede comprender uno o más tejidos o muestras biológicas de referencia que se pueden usar como un control negativo (muestra que deriva de un mamífero no infectado; etapa TB0) o como un control positivo (etapas TB2 y/o TB3).

En una puesta en práctica adicional, el kit comprende un medio de cultivo y cualquier compuesto que participe en el cultivo de la muestra del mismo, antes de la puesta en contacto con HBHA o ESAT-6 nativas.

La solicitud también describe un tercer método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis activa y un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* activa, o que presenta una tuberculosis latente, comprendiendo dicho método

- a) obtener una muestra biológica de sitios de infección local en dicho mamífero;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica con la forma nativa o recombinante de HBHA en condiciones apropiadas para obtener un efecto en IFN- γ ;
- c) medir el efecto de la puesta en contacto en el IFN- γ específico de HBHA

en el que el efecto en IFN- γ específico de HBHA es mayor en un mamífero que presenta una tuberculosis activa que en un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente.

En el contexto de la solicitud, la expresión "sitios de infección local" comprende cualquier sitio en el que se establece el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que se ha provocado una infección. Esta definición incluye así los pulmones, los ganglios linfáticos, la pleura (espacio pleural), las articulaciones, los huesos, el aparato genitourinario, las meninges, el peritoneo, el tubo digestivo, el sistema nervioso central, las glándulas suprarrenales, o el pericardio. En este método, se excluyen todas las muestras de origen sanguíneo, incluyendo PBMC.

Este método comprende poner en contacto una muestra biológica con la forma nativa o recombinante de HBHA que provoca la estimulación de células de dicha muestra. La expresión "forma recombinante de HBHA", como se usa en este tercer método, significa la forma completa no metilada de HBHA, tal como la purificada a partir de la cepa de *E. coli* (BL21(DE3) (pET-HBHA).

Entonces se determina el efecto de dicha estimulación sobre IFN- γ . La expresión "efecto en IFN- γ " significa cualquier modificación con respecto a la expresión de IFN- γ , tanto a nivel transcripcional (ARNm) o traduccional (proteína), con respecto a la degradación de IFN- γ , maduración (tal como glicosilación) o secreción.

Una muestra derivada de sitios de infección local se pone en contacto con HBHA en condiciones que son apropiadas para obtener un efecto en IFN- γ , que se pueden modificar por el experto en la materia, tal como en la elección del medio, el pH y la temperatura del medio para el contacto, el período de contacto, la dilución de la muestra biológica, y las concentraciones de proteína HBHA.

En una puesta en práctica de la solicitud, la cantidad de IFN- γ segregado se mide usando cualquier técnica conocida para medir la cantidad de un compuesto, tal como ELISA, ELISPOT, citometría de flujo (FACS) o RT-PCR cuantitativa.

La cantidad de IFN- γ específico de HBHA segregada a partir de una muestra biológica procedente de un mamífero que presenta una tuberculosis activa es más de 1000, más de 2000 pg/ml, más de 5000 pg/ml, o más de 10000 pg/ml. Por tanto, una cantidad en el intervalo de 5000 a 45000 pg/ml, o en el intervalo 10000 a 45000 pg/ml, confirma una forma activa de tuberculosis. Por el contrario, una cantidad de IFN- γ específico de HBHA, segregada

de una muestra biológica, de cero o menos de 100, 400 o 1000 pg/ml confirma la ausencia de infección por *M. tuberculosis* o una forma latente de tuberculosis.

En una puesta en práctica adicional, la proporción de células positivas para el marcaje de IFN- γ se cuantifica mediante la diferencia entre el porcentaje de células que expresan IFN- γ tras la estimulación con HBHA durante 16 horas y el porcentaje de células que producen IFN- γ sin estimulación (secreción espontánea). Este cálculo se lleva a cabo en células de la muestra biológica seleccionadas para el protocolo de cuantificación, tales como linfocitos, células CD4⁺, o cualquier otra subpoblación linfocitaria. El marcaje se lleva a cabo por cualesquier medios conocidos para el marcaje intracelular de un compuesto y que puede usar agentes de permeabilización tales como saponina (0,01% a 0,1%), triton (0,1%), digitonina, y/o agentes que fijan células, tales como paraformaldehído al 2%, o anticuerpos, opcionalmente marcados radioactivamente o acoplados a fluorocromos.

Tras el contacto de la muestra con HBHA, se añade Brefeldina A (10 μ g/ml) a la muestra durante 3 a 5 horas a 37°C o a temperatura ambiente, para bloquear cualquier secreción de células contenidas en la muestra. Las células se fijan entonces con un agente de fijación, tales como los descritos anteriormente, durante 15 a 30 minutos a 4°C, y después se permeabilizan con agentes de permeabilización tales como los descritos anteriormente, durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyen en una disolución de permeabilización (10 mg/ml) y se añaden para la incubación a 15 a 30 minutos a 4°C. Los antígenos de superficie tales como CD4 o CD8 se marcan antes de la fijación con el agente de fijación al que son sensibles, o después de la permeabilización para aquellos que son resistentes a la fijación. Entonces, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo.

Por tanto, la proporción de células obtenidas a partir de la muestra biológica procedente de un mamífero que presenta una tuberculosis activa es superior a 0,3%, superior a 0,5%, superior a 0,75%, o superior a 1%. Se pueden obtener valores de 5%, 10%, y hasta 15%. Por el contrario, la proporción de células obtenidas a partir de una muestra biológica procedente de un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente es cero o inferior a 0,2% a 0,3%.

Este método puede demostrar la forma activa de tuberculosis en un mamífero. Por el contrario, una secreción baja de IFN- γ o una pequeña cantidad de IFN- γ intracitoplásmico en los valores mencionados anteriormente revela una ausencia de la forma activa de tuberculosis, y se puede interpretar como una ausencia de infección por *Mycobacterium tuberculosis* o como una forma latente de tuberculosis.

Opcionalmente, en este método se añade una etapa entre la obtención de la muestra biológica y la puesta en contacto con la muestra, que consiste en cultivar dicha muestra biológica.

En una puesta en práctica, la muestra biológica se selecciona del grupo constituido por aspiraciones bronquiales, lavados broncoalveolares (BAL), lavado gástrico, esputo, muestras de fluidos de efusión tales como fluidos pleurales, abdominales y articulares, fluidos cerebrospinales, fluidos cefalorraquídeos, fluidos sinoviales, fluidos peritoneales, fluidos pericardíacos, biopsias de glándulas linfáticas, biopsias transbronquiales, biopsias pleurales y hepáticas, punciones medulares y punciones lumbares, muestras de orina, y aspiraciones de pus.

En una puesta en práctica adicional de la solicitud, las células usadas para dicho método son linfocitos T tales como linfocitos T CD3⁺ CD4⁺.

La solicitud también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que tiene una tuberculosis activa y un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente, comprendiendo dicho kit:

- la forma nativa o recombinante de HBHA;
- unos reactivos para constituir un medio adecuado para poner en contacto las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA nativa o recombinante; los reactivos incluyen los descritos anteriormente en los kits precedentes;
- unos reactivos que permiten la detección de IFN- γ después del contacto. El IFN- γ segregado o intracitoplásmico se mide usando cualquier técnica conocida, y en el kit se pueden proporcionar anticuerpos primarios específicos para IFN- γ , que se pueden marcar, anticuerpos secundarios, que se pueden marcar, capaces de reconocer al anticuerpo primario, y cualquier molécula que pueda amplificar o modular la señal de detección.

El kit comprende opcionalmente uno o más tejidos o muestras biológicas de referencia que se pueden usar como control: una muestra que deriva de un mamífero no infectado (etapa TB0), una muestra de la etapa TB2 y/o una muestra de la etapa TB3.

En una puesta en práctica, el kit comprende un medio de cultivo y cualquier compuesto que participa en el cultivo de la muestra antes de la puesta en contacto con HBHA.

Los siguientes ejemplos son proporcionados a título ilustrativo de la solicitud o invención, y de ningún modo limitan el alcance de la solicitud o invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Origen de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes tuberculosos y de pacientes con tuberculosis latente, después de haber obtenido su autorización. Los pacientes tuberculosos se seleccionaron sobre la base de un examen directo positivo y/o un cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los sujetos se incorporaron antes del final de las primeras tres semanas de tratamiento. Los sujetos que tienen una forma latente de tuberculosis se seleccionaron sobre la base de una prueba de hipersensibilidad retrasada positiva a tuberculina (diámetro de la induración de aproximadamente 18 mm en el momento del diagnóstico). Se excluyó una forma activa de tuberculosis sobre la base de una radiografía de tórax normal. Todos de

- la forma nativa de HBHA y ESAT-6;
- unos reactivos para constituir un medio para llevar a cabo el contacto, de una manera independiente, de las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA y ESAT-6 nativas; los reactivos incluyen los descritos anteriormente para el kit precedente;
- unos reactivos para detectar la secreción de IFN- γ tras el contacto. El IFN- γ segregado se medirá usando cualquier técnica conocida, y se pueden incluir en el kit anticuerpos primarios específicos para IFN- γ , opcionalmente marcados, o anticuerpos secundarios, opcionalmente marcados, capaces de reconocer el anticuerpo primario, así como cualquier molécula que pueda amplificar o modular la señal de detección.

Opcionalmente, el kit también puede comprender uno o más tejidos o muestras biológicas de referencia que se pueden usar como un control negativo (muestra que deriva de un mamífero no infectado; etapa TB0) o como un control positivo (etapas TB2 y/o TB3).

En una puesta en práctica adicional, el kit comprende un medio de cultivo y cualquier compuesto que participe en el cultivo de la muestra del mismo, antes de la puesta en contacto con HBHA o ESAT-6 nativas.

La presente solicitud también describe un tercer método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis activa y un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* activa, o que presenta una tuberculosis latente, comprendiendo dicho método

- a) obtener una muestra biológica de sitios de infección local en dicho mamífero;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica con la forma nativa o recombinante de HBHA en condiciones apropiadas para obtener un efecto en IFN- γ ;
- c) medir el efecto de la puesta en contacto en el IFN- γ específico de HBHA

en el que el efecto en IFN- γ específico de HBHA es mayor en un mamífero que presenta una tuberculosis activa que en un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente.

En el contexto de la solicitud, la expresión "sitios de infección local" comprende cualquier sitio en el que se establece el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, y en el que se ha provocado una infección. Esta definición incluye así los pulmones, los ganglios linfáticos, la pleura (espacio pleural), las articulaciones, los huesos, el aparato genitourinario, las meninges, el peritoneo, el tubo digestivo, el sistema nervioso central, las glándulas suprarrenales, o el pericardio. En este método, se excluyen todas las muestras de origen sanguíneo, incluyendo PBMC.

Este método comprende poner en contacto una muestra biológica con la forma nativa o recombinante de HBHA que provoca la estimulación de células de dicha muestra. La expresión "forma recombinante de HBHA", como se usa en este tercer método, significa la forma completa no metilada de HBHA, tal como la purificada a partir de la cepa de *E. coli* (BL21(DE3) (pET-HBHA).

Entonces se determina el efecto de dicha estimulación en IFN- γ . La expresión "efecto en IFN- γ " significa cualquier modificación con respecto a la expresión de IFN- γ , tanto a nivel transcripcional (ARNm) o traduccional (proteína), con respecto a la degradación de IFN- γ , maduración (tal como glicosilación) o secreción.

Una muestra derivada de sitios de infección local se pone en contacto con HBHA en condiciones que son apropiadas para obtener un efecto en IFN- γ , que se pueden modificar por el experto en la materia, tal como en la elección del medio, el pH y la temperatura del medio para el contacto, el período de contacto, la dilución de la muestra biológica, y las concentraciones de proteína HBHA.

5 En una puesta en práctica de la invención, la cantidad de IFN- γ segregado se mide usando cualquier técnica conocida para medir la cantidad de un compuesto, tal como ELISA, ELISPOT, citometría de flujo (FACS) o RT-PCR cuantitativa.

10 La cantidad de IFN- γ específico de HBHA segregada a partir de una muestra biológica procedente de un mamífero que presenta una tuberculosis activa es más de 1000, más de 2000 pg/ml, más de 5000 pg/ml, o más de 10000 pg/ml. Por tanto, una cantidad en el intervalo de 5000 a 45000 pg/ml, o en el intervalo 10000 a 45000 pg/ml, confirma una forma activa de tuberculosis. Por el contrario, una cantidad de IFN- γ específico de HBHA, segregada de una muestra biológica, de cero o menos de 100, 400 o 1000 pg/ml confirma la ausencia de infección por *M. tuberculosis* o una forma latente de tuberculosis.

15 En una puesta en práctica adicional, la proporción de células positivas para el marcaje de IFN- γ se cuantifica mediante la diferencia entre el porcentaje de células que expresan IFN- γ tras la estimulación con HBHA durante 16 horas y el porcentaje de células que producen IFN- γ sin estimulación (secreción espontánea). Este cálculo se lleva a cabo en células de la muestra biológica seleccionadas para el protocolo de cuantificación, tales como linfocitos, células CD4⁺, o cualquier otra subpoblación linfocitaria. El marcaje se lleva a cabo por cualquier medio conocido para el marcaje intracelular de un compuesto y que puede usar agentes de permeabilización tales como saponina (0,01% a 0,1%), triton (0,1%), digitonina, y/o agentes que fijan células, tales como paraformaldehído al 2%, o anticuerpos, opcionalmente marcados radioactivamente o acoplados a fluorocromos.

20 Tras el contacto de la muestra con HBHA, se añade Brefeldina A (10 μ g/ml) a la muestra durante 3 a 5 horas a 37°C o a temperatura ambiente, para bloquear cualquier secreción de células contenidas en la muestra. Las células se fijan entonces con un agente de fijación, tales como los descritos anteriormente, durante 15 a 30 minutos a 4°C, y después se permeabilizan con agentes de permeabilización tales como los descritos anteriormente, durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyen en una disolución de permeabilización (10 mg/ml) y se añaden para la incubación a 15 a 30 minutos a 4°C. Los antígenos de superficie tales como CD4 o CD8 se marcan antes de la fijación con el agente de fijación al que son sensibles, o después de la permeabilización para aquellos que son resistentes a la fijación. Entonces, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo.

30 Por tanto, la proporción de células obtenidas a partir de la muestra biológica procedente de un mamífero que presenta una tuberculosis activa es mayor que 0,3%, mayor que 0,5%, mayor que 0,75%, o mayor que 1%. Se pueden obtener valores de 5%, 10%, y hasta 15%. Por el contrario, la proporción de células obtenidas a partir de una muestra biológica procedente de un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente es cero o menor que 0,2% a 0,3%.

35 Este método puede demostrar la forma activa de tuberculosis en un mamífero. Por el contrario, una secreción baja de IFN- γ o una pequeña cantidad de IFN- γ intracitoplásmico en los valores citados anteriormente revela una ausencia de la forma activa de tuberculosis, y se puede interpretar como una ausencia de infección por *Mycobacterium tuberculosis* o como una forma latente de tuberculosis.

40 Opcionalmente, en este método se añade una etapa entre la obtención de la muestra biológica y la puesta en contacto con la muestra, que consiste en cultivar dicha muestra biológica.

45 En una puesta en práctica, la muestra biológica se selecciona del grupo constituido por aspiraciones bronquiales, lavados broncoalveolares (BAL), lavado gástrico, esputo, muestras de fluidos de efusión tales como fluidos pleurales, abdominales y articulares, fluidos cerebrospinales, fluidos cefalorraquídeos, fluidos sinoviales, fluidos peritoneales, fluidos pericardíacos, biopsias de glándulas linfáticas, biopsias transbronquiales, biopsias pleurales y hepáticas, punciones medulares y punciones lumbares, muestras de orina, y aspiraciones de pus.

50 En una puesta en práctica adicional de la invención, las células usadas para dicho método son linfocitos T tales como linfocitos T CD3⁺ CD4⁺.

55 La invención también describe un kit para detectar y diferenciar entre un mamífero que tiene una tuberculosis activa y un mamífero no infectado por *M. tuberculosis* o que presenta una tuberculosis latente, comprendiendo dicho kit:

- la forma nativa o recombinante de HBHA;

- unos reactivos para constituir un medio adecuado para poner en contacto las células presentes en la muestra biológica procedente de dicho mamífero con HBHA nativa o recombinante; los reactivos incluyen los descritos anteriormente en los kits precedentes;

- 5 • unos reactivos que permiten la detección de IFN- γ después del contacto. El IFN- γ segregado o intracitoplásmico se mide usando cualquier técnica conocida, y en el kit se pueden proporcionar anticuerpos primarios específicos para IFN- γ , que se pueden marcar, anticuerpos secundarios, que se pueden marcar, que pueden reconocer al anticuerpo primario, y cualquier molécula que pueda amplificar o modular la señal de detección.

10 El kit comprende opcionalmente uno o más tejidos o muestras biológicas de referencia que se pueden usar como control: una muestra que deriva de un mamífero no infectado (etapa TB0), una muestra de la etapa TB2 y/o una muestra de la etapa TB3.

15 En una puesta en práctica, el kit comprende un medio de cultivo y cualquier compuesto que participa en el cultivo de la muestra antes de la puesta en contacto con HBHA.

Los siguientes ejemplos son proporcionados a título ilustrativo de la presente invención, y de ningún modo limitan el alcance de la invención.

20 Ejemplos

Ejemplo 1. Origen de las muestras de sangre

25 Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes tuberculosos y de pacientes con tuberculosis latente, después de haber obtenido su autorización. Los pacientes tuberculosos se seleccionaron sobre la base de un examen directo positivo y/o un cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los sujetos se incorporaron antes del final de las primeras tres semanas de tratamiento. Los sujetos que tienen una forma latente de tuberculosis se seleccionaron sobre la base de una prueba de hipersensibilidad retrasada positiva a tuberculina (diámetro de la induración de aproximadamente 18 mm en el momento del diagnóstico). Se excluyó una forma activa de tuberculosis en base a una radiografía de tórax normal. Todos los pacientes fueron seronegativos para VIH, y ninguno había recibido tratamiento inmunosupresor. Todos los sujetos vivían en Europa en el momento del reclutamiento.

35 Ejemplo 2: Otras muestras

Se retiró fluido de lavado broncoalveolar (BAL), mediante fibroscopía, después de inyectar alrededor de 200 ml de agua fisiológica. El volumen retirado se centrifugó entonces (alrededor de 10 ml).

40 Se recogieron fluidos pleural, articular, peritoneal, cefalorraquídeo y otros fluidos en jeringuillas estériles, y se centrifugaron tan pronto como llegaron al laboratorio.

Para los ganglios y otras masas sospechosas, se llevó a cabo la exéresis quirúrgica. Al llegar al laboratorio, el fragmento anatómico recogido se rompió en pequeños trozos y se incubó en un medio de cultivo para permitir la liberación progresiva de células desde el tejido.

45 Ejemplo 3: Antígenos

La forma nativa de HBHA (nHBHA) se purificó a partir de BCG de *M. bovis* mediante cromatografía con heparina-sefariosa seguido de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), como se describe en otra parte (14). Un cromatograma de HPLC y el análisis de SDS-PAGE tras la tinción con Azul de Coomassie demostraron que la preparación no tuvo contaminación proteica. No se encontraron trazas de glicolípidos usando cromatografía de gases. El ensayo de limulus mostró que la concentración de lipopolisacárido fue menor que 10 pg/ml.

55 La forma recombinante no metilada (rHBHA) se purificó a partir de la cepa (BL21(DE3)(pET-HBHA) de *E. coli*. El grado de metilación de la proteína recombinante en comparación con el de la proteína nativa se describió en la patente francesa FR-A-01/14953.

La forma recombinante truncada de la porción C terminal (rHBHA Δ C) se purificó a partir de la cepa (BL21(DE3)(pET-rHBHA Δ C) de *E. coli*. Esta forma truncada rHBHA Δ C se describió en Pethe et al (2000 Journal of Biological Chemistry 275(19): 14273-14280, incorporado a la presente memoria como referencia), y deriva de la proteína HBHA recombinante de la que se han suprimido los aminoácidos 161 a 199.

El péptido C terminal aislado, sintetizado mediante combinación con aminoácidos premetilados, corresponde a los aminoácidos 161 a 199 de la proteína HBHA, y tiene la siguiente secuencia:

KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK (SEC ID NO: 1) (12, 13). Pethe et al (Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 10759-10764) y Temmerman et al (Nat. Med. 2004 Sep, 10(9): 935-941) se incorporan aquí como referencia.

5 Ejemplo 4: Detección de IgG específico de HBHA

Se usó ELISA para detectar IgG anti-nHBHA, -rHBHA, -rHBHA Δ C y -péptido C (péptido C-terminal aislado). Con detalle, se incubaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc) toda la noche a 4°C con 50 μ l/pocillo de una disolución de 1,5 μ g/l de antígeno diluido en PBS (nHBHA, rHBHA, rHBHA Δ C o péptido C). Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (0,05%) y se saturaron con una disolución de caseína al 1% en PBS durante 1 h a 37°C. Después del lavado, los sueros de los pacientes, diluidos en una disolución de PBS-Tween 20 (0,05%) (diluciones de 1:50 a 1:12800), se colocaron durante 30 min. en los pocillos a la temperatura ambiente y con agitación). Los anticuerpos de cabra anti-IgG humana acoplados con biotina diluidos 250 veces en PBS-Tween 20 (0,05%) fueron los anticuerpos secundarios usados (anti-IgG humana de cabra biotinilado – Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, USA 2040-08), su presencia se reveló mediante 50 μ l/pocillo de una disolución de peroxidasa (conjugado de peroxidasa con estravidina, E2886 - Sigma) diluida en 1:1000 (caseína al 0,5%). Se añadieron 50 μ l de una disolución de sustrato (0,1 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y 1 μ l/ml de peróxido de hidrógeno al 30% en citrato de sodio 0,1 M, pH 5) después de lavar durante un período de 10 a 30 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo mediante 25 μ l/pocillo de ácido clorhídrico (2 mM mol/l). El título de anticuerpo se expresa como la última dilución sérica que se considera que es positiva con respecto a un conjunto de sueros negativos.

Ejemplo 5: Secreción de interferón gamma por PBMC en respuesta a nHBHA/ESAT-6 (ELISA)

Las PBMC se obtuvieron centrifugando en gradiente de densidad muestras de sangre periférica (lymphoprep – Nycomed Pharma). Dichas PBMC se resuspendieron en una concentración de 2×10^6 células/ml en medio de cultivo (RPMI completo: RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementado con 40 μ g/ml de gentamicina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 1X aminoácidos no esenciales (Life Technologies) y 10% de suero fetal de ternera (FCS)). Las células se estimularon con 2 μ g/ml de nHBHA y en paralelo con 5 μ g/ml de diana 6 antigénica segregada temprana (ESAT-6) (Statens Serum Institut, Dinamarca) durante un período de 96 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. En algunos experimentos, se añadieron anticuerpos de bloqueo en una concentración de 5 μ g/ml: anti-TGF- β 1,2,3 (IgG1 de ratón, R&D System), y los resultados se compararon con los obtenidos en presencia de anticuerpos de control (IgG1 de ratón; R&D System). Los sobrenadantes se recogieron después de 4 días de cultivo para medir el IFN- γ segregado usando ELISA (IFN- γ Cytoset, Biosource).

Ejemplo 6: Respuesta local de interferón gamma

Ejemplo 6a: Fluidos biológicos y partes anatómicas

Los fluidos biológicos analizados fueron fluidos pleurales, articulares y peritoneales. Las partes anatómicas analizadas fueron biopsias cortadas de ganglios y procedentes de diversas masas sospechosas. El aislamiento de elementos nucleados a partir de los fluidos biológicos se llevó a cabo mediante una primera filtración (tamiz celular, Nylon 100 μ m Falcon® 352360) seguido de la centrifugación a 2300 rpm durante 15 minutos. En caso necesario, se lisaron los glóbulos rojos presentes en el residuo celular. Las células se resuspendieron entonces en una disolución de RPMI completo. Los elementos nucleados de las muestras anatómicas se aislaron rompiendo las partes e incubando toda la noche en una disolución de RPMI completo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los sobrenadantes se recuperaron, y las partes se aclararon para recuperar cualesquiera células que todavía eran accesibles. Estos fluidos cosechados se centrifugaron entonces a 2300 rpm durante 15 minutos. Si es necesario, se lisaron los glóbulos rojos. El residuo celular se resuspendió en una disolución de RPMI completo.

Ejemplo 6b: Estimulación antigénica

Cuando el número de células aisladas fue suficiente (fluidos pleurales), se estimularon *in vitro* de la misma manera que las PBMC, y las concentraciones de IFN- γ segregado se midieron en los sobrenadantes de cultivo después de una estimulación durante 96 horas *in vitro* mediante HBHA. Al igual que para las PBMC, el análisis de la síntesis de IFN- γ por estas células también se pudo llevar a cabo mediante citometría de flujo después de una breve estimulación *in vitro* mediante HBHA como se describe a continuación para fluidos broncoalveolares, fluidos articulares o peritoneales, ganglios, etc. Las células aisladas (2×10^6 /ml) se estimularon *in vitro* mediante HBHA a una concentración de 10 μ g/ml durante un período de 16 a 18 horas. Las secreciones de citocina a partir de las células se bloquearon entonces incubando durante 4 horas en presencia de Brefeldina A (10 μ g/ml de Brefeldina A – Sigma), y la presencia de IFN- γ en las células se analizó mediante citometría de flujo después de marcar las células. Después de fijar las células, se permeabilizaron (Fix and Perm; Cell Permeabilization Kit - Caltag Laboratories), se lavaron, después se incubaron en la oscuridad durante 30 min. en presencia de anticuerpos acoplados a fluorocromos (anti-CD3 PerCP, anti-CD4 APC, anti-IFN- γ PE, todos obtenidos de Becton, Dickinson). El porcentaje de células positivas se analizó entonces con un citómetro FACSCalibur, inicialmente seleccionando linfocitos sobre

la base de su tamaño y granularidad, y después las diferentes subpoblaciones linfocitarias como una función de la expresión del marcador de superficie.

Ejemplo 7: Análisis estadísticos

Para los datos no pareados, se llevó a cabo la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, seguido de comparaciones después de las pruebas usando las pruebas de Dunn. Los datos pareados se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon o de Friedman.

Análisis de Característica Operativa del Receptor (ROC): cada punto en la curva (Figura 12) corresponde a un par específico de sensibilidad y especificidad, calculado según valores dados en las tablas 1, 2 o 3. La curva completa (y particularmente el área debajo de ella) proporciona un resumen del ensayo global. Las curvas buenas se encuentran más próximas a la esquina izquierda superior, mientras que en el peor caso se obtiene una línea diagonal (línea discontinua).

El área total bajo la curva ROC es una medida del comportamiento del ensayo de diagnóstico, ya que refleja el comportamiento del ensayo en todos los niveles de corte posibles. El área cae en el intervalo [0,5-1] y el área más grande, el mejor comportamiento del ensayo. La exactitud del ensayo se clasifica según el área bajo la curva, según lo siguiente: [0,9-1]: excelente; [0,8-0,9]: buena; [0,7-0,8]: aceptable; [0,6-0,7]: mala, y [0,5-0,6]: falla.

Se usan las siguientes definiciones:

- Sensibilidad: probabilidad de tener un ensayo positivo entre los pacientes que tienen un diagnóstico positivo: positivo verdadero (TP);
- Especificidad: probabilidad de tener un ensayo negativo entre los pacientes que tienen un diagnóstico negativo: negativo verdadero (TN);
- (1-especificidad): probabilidad de tener un ensayo positivo entre los pacientes que tienen un diagnóstico negativo: falso positivo (FP);
- (1-sensibilidad): probabilidad de tener un ensayo negativo entre los pacientes que tienen un diagnóstico positivo: falso negativo (FN);

El ensayo de ROC permite encontrar un valor de corte óptimo, para el que la sensibilidad y especificidad son elevadas.

Resultados

1. Respuesta humoral

Los IgGs específicos de nHBHA se detectaron en el suero de aproximadamente 40% de sujetos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, tanto si tenían buena salud (sujetos primoinfectados o forma latente) como si estaban enfermos y presentaban tuberculosis (forma activa). Los títulos de anticuerpos encontrados en estos dos grupos de sujetos no fueron diferentes (figura 1).

Sin embargo, una comparación de los títulos de anticuerpo dirigidos contra la forma metilada nativa de HBHA (nHBHA) con aquellos dirigidos contra la forma recombinante no metilada (rHBHA) posibilitó la hipótesis de que los anticuerpos fueron diferentes dependiendo de si los pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* estaban enfermos (forma activa) o no (forma latente). Como se puede observar en la figura 2, los títulos de IgG anti-nHBHA fueron significativamente mayores que los títulos de IgG anti-rHBHA ($p = 0,0015$) en sujetos primoinfectados (figura 2A), mientras que las diferencias no fueron significativas en pacientes tuberculosos (figura 2B). Entonces se evaluó IgG dirigido, por un lado, contra una forma recombinante truncada de HBHA compuesta solamente por el dominio N-terminal de la molécula (rHBHA Δ C), y por otro lado, aquellos dirigidos contra el péptido C-terminal metilado. Estos resultados, mostrados en la figura 3, indican que el IgG anti-nHBHA presente en el suero de pacientes tuberculosos reconoce rHBHA Δ C (figura 3A), mientras que los anticuerpos de sujetos primoinfectados reconocen el péptido C-terminal metilado (figura 3B). Dependiendo del tipo de anticuerpo presente en el suero de sujetos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, se pudieron así clasificar en dos grupos, primoinfectados o enfermos, dependiendo de si los IgG se dirigían contra la porción N-terminal no metilada de HBHA o contra la porción C-terminal metilada.

2. Secreción de IFN- γ por linfocitos circulantes

- a. Se ha mostrado previamente que la secreción de IFN- γ en respuesta a la forma nativa de HBHA por PBMCs es significativamente mayor en sujetos primoinfectados que en pacientes tuberculosos. La discriminación obtenida, sin embargo, no fue suficiente para ser usada con fines de diagnóstico. Un incremento en el número de sujetos ensayados permitió que se realizara una selección entre sujetos

primoinfectados, de aquellos para los que el presunto dato de infección fue menor que cinco años. Los resultados mostrados en la figura 4 muestran que la discriminación entre los dos grupos es ligeramente mejor, pero todavía insuficiente.

- 5 b. A fin de evaluar mejor el valor potencial de la secreción de IFN- γ inducida por HBHA nativa para diagnosticar una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis*, se produjeron ROC (curvas operativas del receptor) para establecer la concentración de IFN- γ (corte óptimo) que da la mejor pareja de sensibilidad/especificidad para la cuestión que se planteó.

- 10 1) Diagnóstico de pacientes con TB latente en una población sana (distinción entre pacientes con TB latente y personas no infectadas)

Puesto que las personas que presentan una TB latente (IP) no están enfermas pero representan una fuente potencial de diseminación del bacilo de Koch, el ensayo debe ser capaz de identificar a tales personas en una población sana. Por lo tanto, se produjeron curvas ROC en base a las concentraciones de IFN- γ inducido por HBHA y segregado por PBMCs a partir de sujetos de control (no infectados por *M. tuberculosis* – n = 14) y de personas que presentan una TB latente (n = 46) definido en base a los resultados de la reacción intradérmica a PPD positivo a tuberculina, que es el criterio de diagnóstico de referencia (Tabla 1).

Estado	Número	Valor de IFN γ específico de nHBHA (pg/ml)
TB latente	46	3390, 35, 2500, 18210, 519, 72, 7576, 997, 223, 12750, 32700, 4025, 373, 20505, 1727, 28400, 15820, 16580, 395, 13528, 3790, 6496, 2500, 21440, 3035, 2040, 1545, 16000, 1, 3305, 35550, 121000, 32600, 5092, 988, 269, 608, 78, 1256, 1455, 14, 131, 4933, 532,9, 3565,7, 249,45
Control	14	4, 0, 62, 87, 3, 2, 21, 16, 0, 90, 0, 83, 36, 31,6

20 Tabla 1: Valor de IFN γ específico de nHBHA en pacientes con TB latente y en individuos de control (sanos).

En tal experimento, las personas “positivas” y “negativas” se definen según lo siguiente:

- 25 - TP: probabilidad de tener un ensayo positivo (por encima del corte óptimo) entre los pacientes que tienen una reacción intradérmica positiva a tuberculina;
- FP: probabilidad de tener un ensayo negativo (por debajo del corte óptimo) entre los pacientes que tienen una reacción intradérmica negativa a tuberculina;
- 30 - FN: probabilidad de tener un ensayo positivo (por encima del corte óptimo) entre los pacientes que tienen una reacción intradérmica negativa a tuberculina;
- TN: probabilidad de tener un ensayo negativo (por debajo del corte óptimo) entre los pacientes que tienen una reacción intradérmica positiva a tuberculina;

35 La curva ROC mostrada en la figura 12A a continuación es excelente, puesto que el área bajo la curva es 0,95 (intervalo de confianza 95%: 0,90-1,00; P < 0,0001). Para una concentración de IFN- γ de más de 110 pg/ml (corte óptimo), la sensibilidad del ensayo para un diagnóstico de TB latente es 89,13% (CI95: 76,43 - 96,38), con una especificidad de 100% (CI95: 76,84 - 100).

40 Es digno de mención que los controles en este ensayo de ROC son personas que no se vacunaron para tuberculosis (BCG). La posible interferencia de la vacunación con BCG se ensayó previamente y se dio a conocer en 2002 (Masungi et al. J. Inf. Dis. 2002; 185: 513-20). Estos experimentos preliminares mostraron que los linfocitos circulantes de 15 personas vacunadas con BCG (vacunadas con BCG más de 10 años antes de la toma de muestra de sangre) no segregan IFN- γ en respuesta a HBHA, mientras que sí lo hacen en respuesta a PPD.

45 Sin embargo, puesto que el estudio se refiere a la discriminación de TB en una población de adultos sanos y que en la mayoría de los países la vacunación se lleva a cabo en la niñez, pareció apropiado ensayar en personas vacunadas hace más de 10 años. De estas personas, 5 presentaron una reacción intradérmica positiva a tuberculina, y 3 dieron resultados dudosos. Además, los linfocitos circulantes de 10 de estas personas sanas vacunadas con BCG segregan IFN- γ en respuesta a PPD.

50 En conclusión, parece que la vacunación con BCG no perturba el posible interés de diagnóstico para discriminar pacientes con TB latente entre una población sana, sobre la base de la inducción de IFN- γ *in vitro* por HBHA.

- 55 2) Diagnóstico diferencial entre pacientes con TB latente y con TB activa

Cuando un paciente presenta un historial clínico compatible con tuberculosis y su reacción intradérmica a la tuberculina es positiva, es importante diferenciar tuberculosis de otro trastorno que se puede producir en un paciente

que también tiene TB latente. De este modo, el ensayo debe identificar pacientes con TB latente en una población de pacientes infectados por *M. tuberculosis*. De este modo, se produjeron curvas ROC en base a las concentraciones de IFN- γ inducido por HBHA y segregado por PBMCs, por un lado de sujetos que presentan una TB latente definida en base a los resultados de una reacción intradérmica a tuberculina, que es la referencia de diagnóstico crítica (n = 46), y por otro lado de pacientes que presentan TB activa no tratada (n = 50) (Tabla 2).

Estado	Número	Valor de IFN γ específico de nHBHA (pg/ml)
TB latente	46	3390, 35, 2500, 18210, 519, 72, 7576, 997, 223, 12750, 32700, 4025, 373, 20505, 1727, 28400, 15820, 16580, 395, 13528, 3790, 6496, 2500, 21440, 3035, 2040, 1545, 16000, 1, 3305, 35550, 121000, 32600, 5092, 988, 269, 608, 78, 1256, 1455, 14, 131, 4933, 532.9, 3565,7, 249,45
TB activa	50	14, 12, 41, 82, 167, 18, 11, 50, 50,25, 398, 15, 33, 19, 1, 45, 2, 1, 671, 42, 5, 27, 317, 1, 1, 15, 60, 13, 426, 2249.6, 1145.8, 124.79, 4177.6, 96.7, 586.78, 3317.5, 23, 17748, 781.42, 17, 76, 138, 20, 43, 46, 201, 441, 322, 676, 340,68

Tabla 2: Valor de IFN γ específico de nHBHA en pacientes con TB latente y con TB activa

En tal experimento, las personas positivas y negativas se definen según lo siguiente:

- TP: probabilidad de tener un ensayo positivo (por encima del corte óptimo) entre los pacientes que tienen síndromes de tuberculosis;
- FP: probabilidad de tener un ensayo negativo (por debajo del corte óptimo) entre los pacientes que no tienen síndromes de tuberculosis;
- FN: probabilidad de tener un ensayo positivo (por encima del corte óptimo) entre los pacientes que no tienen síndromes de tuberculosis;
- TN: probabilidad de tener un ensayo negativo (por debajo del corte óptimo) entre los pacientes que tienen síndromes de tuberculosis;

La curva ROC obtenida (figura 12B) es buena, puesto que produce un área bajo la curva de 0,855 (IC 95: 0,777-0,932). Para la concentración umbral de IFN- γ de 480 pg/ml (corte óptimo), la sensibilidad al ensayo para un diagnóstico de TB latente es 76,09% (CI95: 61:23-87,41), con una especificidad de 82% (CI95: 68,56-91,42).

Se debería observar que los resultados para la curva ROC son sustancialmente peores cuando se consideran las concentraciones de IFN- γ inducido por PPD en PBMC. Esta curva (figura 12C), calculada en base a los resultados obtenidos para 31 TB latente y 47 TB activa (Tabla 3), presenta un área bajo la curva de solamente 0,73 (CI95: 0,62-0,84).

Estado	Número	Valor de IFN γ específico de PPD (pg/ml)
TB latente	31	4485, 1057, 25200, 44300, 3760, 2920, 16750, 3520, 61300, 14805, 20700, 4606, 25500, 26240, 27000, 23525, 16950, 26000, 8780, 23650, 285000, 126000, 6400, 12332, 42932, 24137, 822, 2763, 7174, 7746,8, 9435,4
TB activa	47	23, 4650, 445, 4660, 1541, 729, 1448, 1707, 3800, 46800, 3592, 13, 1004, 430, 100, 1135, 20625, 50, 776, 7714, 877, 525, 7742, 1004, 86, 5408, 7748, 45, 4392, 1882, 46, 2211,4, 15882,8, 37738, 630, 34440, 20817, 34680, 7820, 23358, 838, 4014, 23908, 24783, 8852, 8516, 17145, 10781

Tabla 3: Valor de IFN γ específico de PPD en pacientes con TB latente y con TB activa

A partir de los resultados anteriores, parece por lo tanto que la secreción de IFN- γ inducida por HBHA permite diferenciar a pacientes con TB latente de individuos no infectados por *M. tuberculosis* y de pacientes con TB activa, lo que no es posible con los otros ensayos convencionales, ya sea sobre la base de la reacción intradérmica a la prueba de tuberculina o sobre la base de la secreción de IFN- γ inducida por PPD o por ESAT-6. Esto parece debido principalmente a la mejor selección clínica de pacientes.

c. La bibliografía da a conocer que pacientes tuberculosos segregan IFN- γ en respuesta a ESAT-6, contrariamente a sujetos primoinfectados, pero la discriminación no es suficientemente buena, como se muestra en la figura 5.

d. Se deberá mostrar que un cálculo de la relación entre la secreción de IFN- γ específico de nHBHA y la inducida por ESAT-6 puede ofrecer un medio excelente para discriminar entre sujetos primoinfectados que no están enfermos y pacientes tuberculosos ($p = 0,0003$; $n = 8$) (Figura 6). De hecho, la relación es de aproximadamente 0,1 pg/ml para pacientes con TB activa, mientras que la misma relación es de aproximadamente 146,2 pg/ml para pacientes con TB latente, sin valores que solapen.

Estas conclusiones también se aplican para la identificación de un paciente con TB latente en una población sana, puesto que los pacientes no infectados por *M. tuberculosis* no segregan IFN- γ , en respuesta a ESAT-6, o en concentraciones muy bajas (datos no representados).

La adición de un anticuerpo que bloquea anti-TGF- β puede demostrar en muchos casos que la ausencia de secreción de IFN- γ periférico en respuesta a la estimulación linfocitaria por HBHA resulta claramente de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en el paciente enfermo, y no es debida a una ausencia de infección. Como se muestra en la figura 7, en presencia de un anti-TGF- β , las secreciones de IFN- γ a partir de PBMCs de pacientes tuberculosos aumentan significativamente ($p = 0,01$). Esto no se observa con pacientes primoinfectados.

3. Secreción local de IFN- γ en respuesta a nHBHA

En pacientes tuberculosos, en contraste con la ausencia de secreción de IFN- γ por PBMCs en respuesta a nHBHA, la estimulación de células derivadas de sitios de infección local tales como fluidos pleurales, alveolares, peritoneales y articulares permite que se observe una mayor respuesta de IFN- γ en respuesta a la estimulación por nHBHA o rHBHA, en contraste con los sujetos de control no infectados por *Mycobacterium tuberculosis* pero que presentan signos clínicos y radiológicos que son comparables con los de la tuberculosis. Cuando el volumen de la muestra local permite el aislamiento de un número suficiente de linfocitos, estas células se estimularon mediante HBHA nativa, y la cantidad de IFN- γ presente en los sobrenadantes de cultivo se midió mediante ELISA.

Los resultados mostrados en la figura 8 muestran que las concentraciones de IFN- γ segregadas por células pleurales tras la estimulación mediante HBHA son mucho mayores que las segregadas por células procedentes de sujetos de control, sujetos primoinfectados u otros sujetos.

La discriminación entre pacientes tuberculosos y los controles es mucho peor si se usa otro antígeno, tal como PPD, para estimular las células pleurales *in vitro* (Figura 8).

La síntesis de IFN- γ inducido por HBHA por las células pleurales de pacientes con una efusión pleural de origen tuberculoso también se puede demostrar analizando linfocitos usando citometría de flujo. Esta técnica permite la medida de los porcentajes de linfocitos que contienen IFN- γ intracelular, y cuya síntesis se ha inducido mediante estimulación *in vitro* breve mediante HBHA. Esta técnica tiene la ventaja de ser extremadamente rápida, siendo el período de estimulación mediante HBHA de toda la noche, con mayor razón aún se puede proporcionar un resultado en 24 horas. Los resultados mostrados en las figuras 9 y 10 muestran que una gran población de linfocitos CD4⁺ de fluido pleural contiene IFN- γ tras la estimulación mediante HBHA, mientras que éste no es el caso para células pleurales procedentes de efusiones que no son de origen tuberculoso, es decir, individuos no infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 10). Un estudio de la secreción de IFN- γ inducido por HBHA se puede simplificar limitando el análisis a la ventana de linfocitos seleccionada en base a su tamaño y granularidad.

En el caso de tuberculosis pulmonar (sin ataque pleural), se puede realizar un diagnóstico estudiando linfocitos procedente de un fluido de lavado broncoalveolar. De hecho, tras una breve estimulación *in vitro* con HBHA (toda la noche), una proporción elevada de linfocitos CD4⁺ locales (procedentes de sitios de infección local) contienen IFN- γ intracelular, en contraste con linfocitos de pacientes de control (figura 11). La discriminación entre pacientes tuberculosos o no tuberculosos es mejor cuando las células CD4⁺ locales son seleccionadas como dianas en lugar de células CD8⁺ locales (figura 11), y el análisis también se puede limitar a la ventana de linfocitos.

Durante la tuberculosis articular, un porcentaje elevado de linfocitos aislados de la efusión (cultivo de KB positivo en fluido) sintetizan IFN- γ tras una breve estimulación *in vitro* con HBHA, en contraste con linfocitos locales retirados de individuos de control que tienen una efusión de origen no tuberculoso (Tabla 4).

Finalmente, en el caso de peritonitis de origen tuberculoso, 31% de los linfocitos presentes en este fluido contienen IFN- γ intracelular después de una breve estimulación *in vitro* con HBHA. En un caso de adenopatía de origen tuberculoso, 1,8% de los linfocitos respondieron a HBHA al sintetizar IFN- γ , lo que permitió una vez más el diagnóstico del origen tuberculoso del trastorno, en menos de 24 horas (Tabla 4).

Tipo de muestra	Condiciones de estimulación		
	-	PPD	nHBHA
<u>Fluidos articulares (LA)</u>			
LA KB ⁺	3,90	16,00	8,96
LA ctrl 1	0,10	0,20	0,20
LA ctrl 2	0,22	0,63	0,11
LA ctrl 3	0,05	0,09	0,09
LA ctrl 4	0,05	1,03	0,10
<u>Fluido peritoneal KB⁺</u>	Nd	Nd	31,360
<u>Adenopatía tuberculosa</u>	0,72	1,99	1,82

Tabla 4: Porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD3⁺ que contienen IFN-γ tras la estimulación mediante nHBHA de linfocitos aislados en el sitio de infección tuberculosa, frente a controles; -: sin estimulación; Nd: no determinado; KB⁺: positivo a bacilo de Koch.

5 Referencias

1. Frieden T.R., Sterling T.R., Munsiff S.S. et al. Lancet 2003; 362: 887-99.
2. Maher D., Chalet P., Spinaci S. et al. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 2ª ed. Ginebra: O.M.S. 1997.
3. Siddiqi K., Lambert M. L., Walley J. The Lancet Infect. Dis. 2003; 3: 288-296.
4. Strumpf I., Tsang A., Syre J. Am. Rev. Respir. Dis. 1979; 119: 599-602.
5. Travis W. et al. Mycobacterial pneumonias. En: West King D, ed. Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract, 1ª ed. Washington DC: AFIP; 2002: 579-87.
6. Hruban RH, Hutchins GM. Mycobacterial infections. En: Dail DH, Hammar SP, eds. Pulmonary pathology, 2ª ed. New York: Springer Verlag; 1994: 331-50.
7. Kaufmann SH.: Nat. Rev. Immunol. 201; 1: 20-30.
8. Converse PJ, Jones SL, Astemborski J et al. J. Infect. Dis. 1997; 176: 144-50.
9. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M. et al. The Lancet 2000; 356: 1099-1104.
10. Pethe K., Ouech V., Daffe M. et al. Mol. Microbiol. 2001; 39: 89-99.
11. Pethe K., Alonso S., Biet F. et al. Nature 2001; 412: 190-194.
12. Pethe K., Bifani P., Drobecq H. et al. Proc. Natl Acad. Sci 2002; 99: 10759-10764.
13. Temmerman S., Pethe K., Parra M. et al. enviado.
14. Masungi C., Temmerman S., Van Vooren J.P. et al. J. Infect. Dis. 2002; 185: 513-520.

Listado de secuencias

- <110> INSTITUT PASTEUR DE LILLE
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)
UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES
UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE II
- <120> DETECCIÓN DE LA TUBERCULOSIS E INFECCIÓN POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
UTILIZANDO HBHA
- <130> B06065AJA - JAZ / LV / KN
- <140> EP XXXXXX
<141> 2010-11-09
- <150> FR 0407255
<151> 2004-06-30
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 39
<212> PRT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*
<220>
- <221> DOMINIO
<222> (1)..(39)

ES 2 523 471 T3

<400> 1

Lys	Lys	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala
1				5				10						15	
Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala
			20					25					30		
Ala	Lys	Lys	Val	Thr	Gln	Lys									
		35													

5

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar y diferenciar entre un mamífero que presenta una tuberculosis latente y un mamífero que presenta una tuberculosis activa, o para identificar un mamífero que presenta una tuberculosis latente en una población sana, comprendiendo dicho método
- a) poner en contacto, de una manera independiente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de dicho mamífero con la forma nativa de la adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) y con la diana 6 antigénica secretora temprana (ESAT-6) en condiciones que permiten la secreción de IFN- γ ;
- b) medir la concentración de IFN- γ específico de HBHA y la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6 mediante ELISA; y
- c) calcular la relación de la concentración de IFN- γ específico de HBHA respecto a la concentración de IFN- γ específico de ESAT-6, en el que dicha relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis latente es superior a 1, mientras que la relación obtenida en un mamífero que presenta una tuberculosis activa es inferior a 1.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la relación de concentraciones obtenida de la muestra de un mamífero que presenta una tuberculosis latente se encuentra en el intervalo 100 a 400.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la relación de concentraciones obtenida de la muestra de un mamífero que presenta una tuberculosis activa es inferior a 0,5.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en aspiraciones bronquiales, lavados broncoalveolares (BAL), lavado gástrico, esputo, muestras de fluidos de efusión tales como fluidos pleurales, abdominales y articulares, fluidos cerebroespinales, fluidos cefalorraquídeos, fluidos sinoviales, fluidos peritoneales, fluidos pericardíacos y otros fluidos corporales, biopsias de ganglios linfáticos, biopsias transbronquiales, biopsias pleurales y hepáticas, punciones medulares y punciones lumbares, muestras de orina o sangre, y aspiraciones de pus.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la etapa suplementaria anterior a la etapa a) de cultivar la muestra biológica.

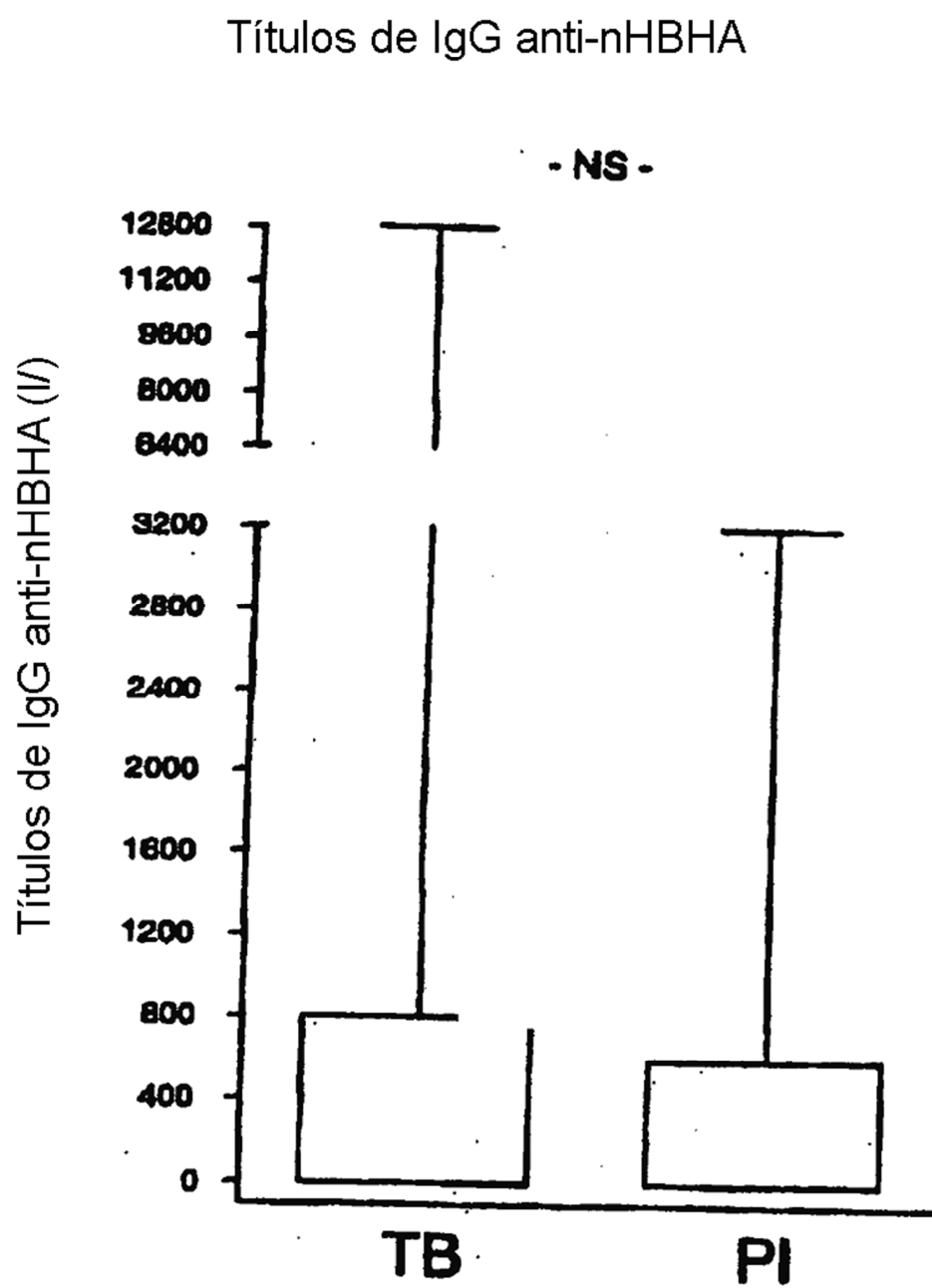


Fig. 1

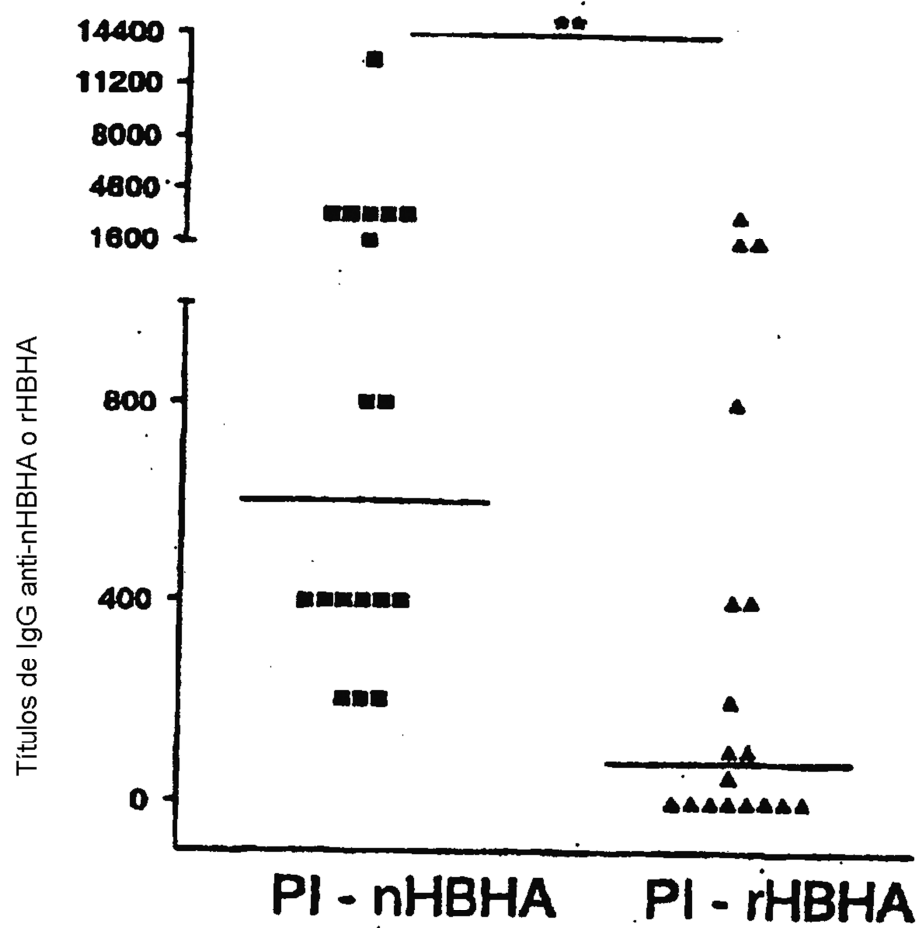


Fig. 2A

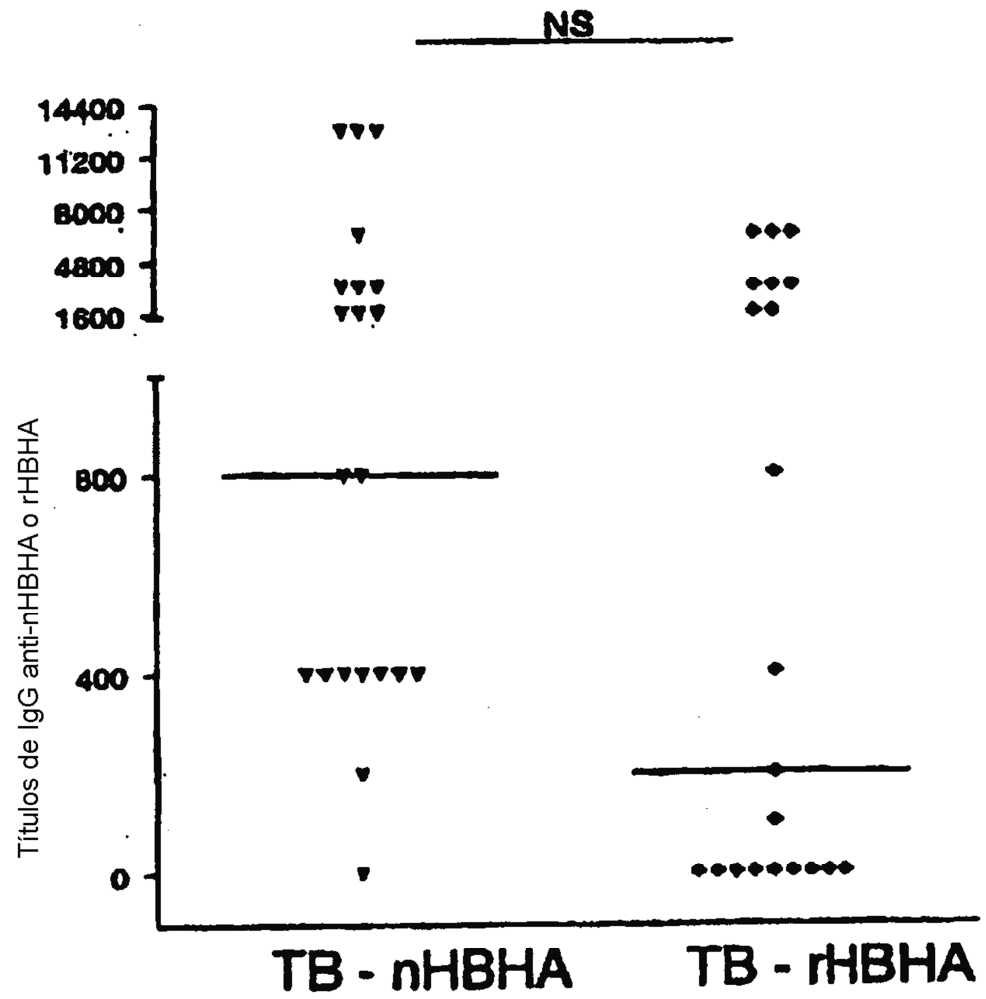


Fig. 2B

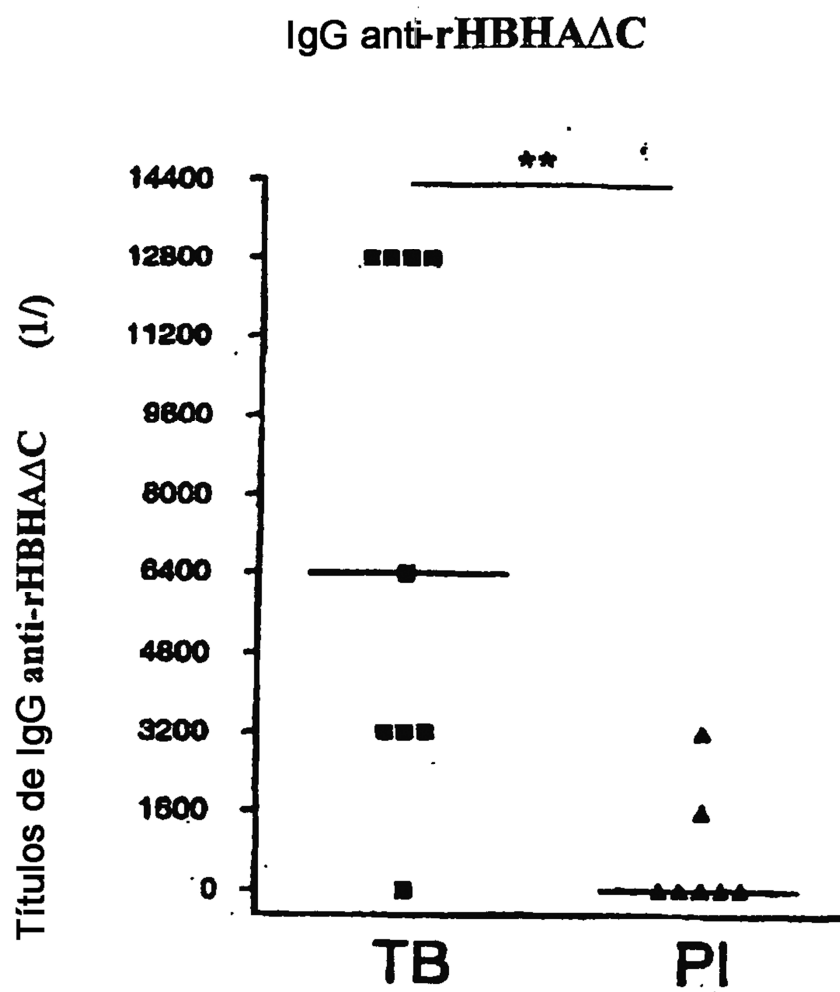


Fig. 3A

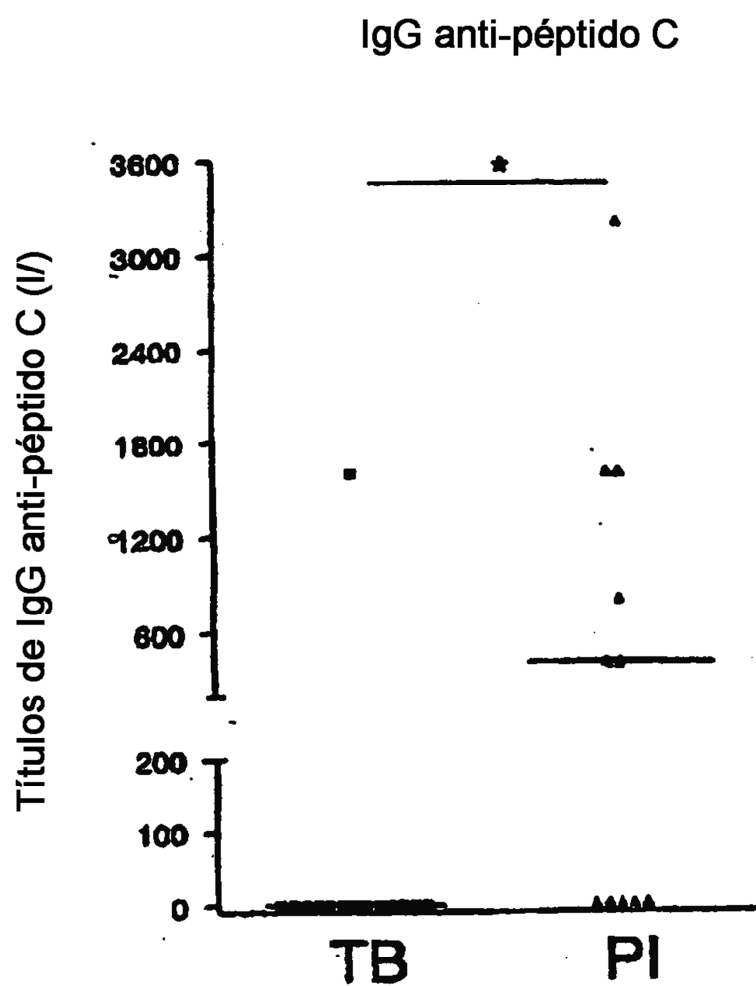


Fig. 3B

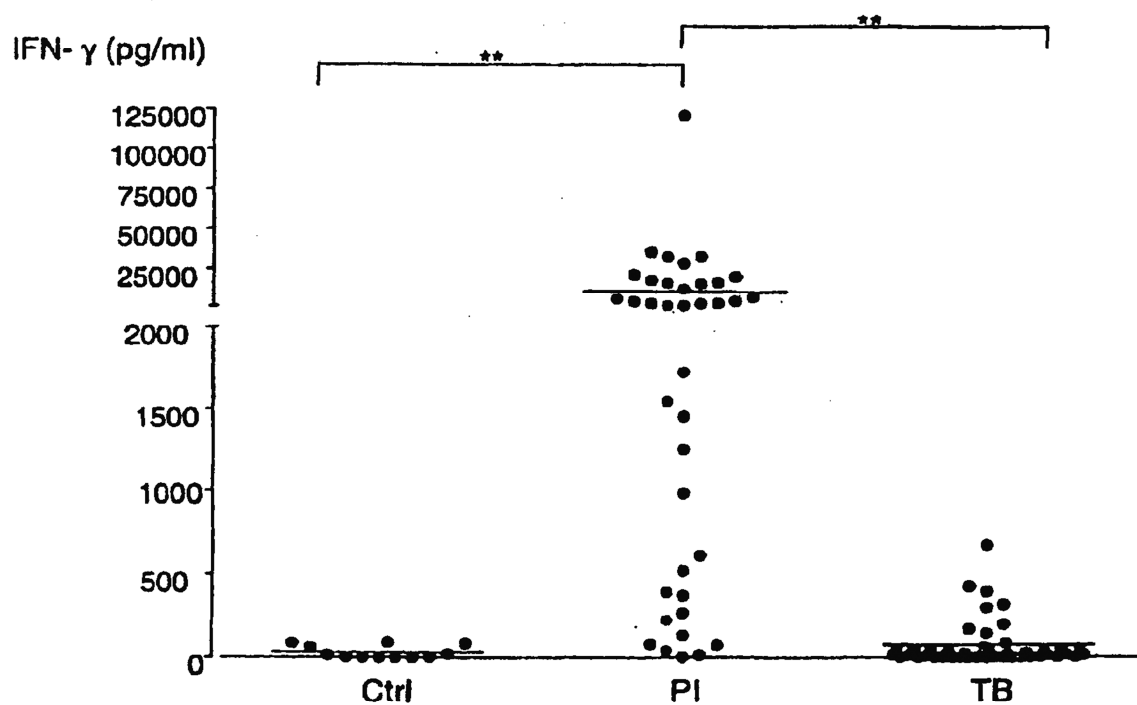


Fig. 4

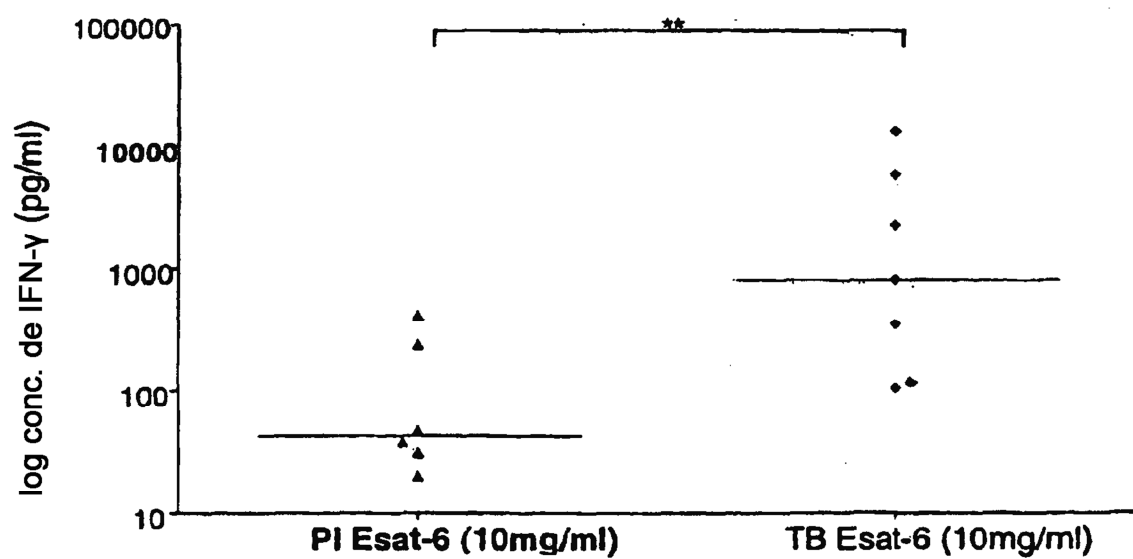


Fig. 5

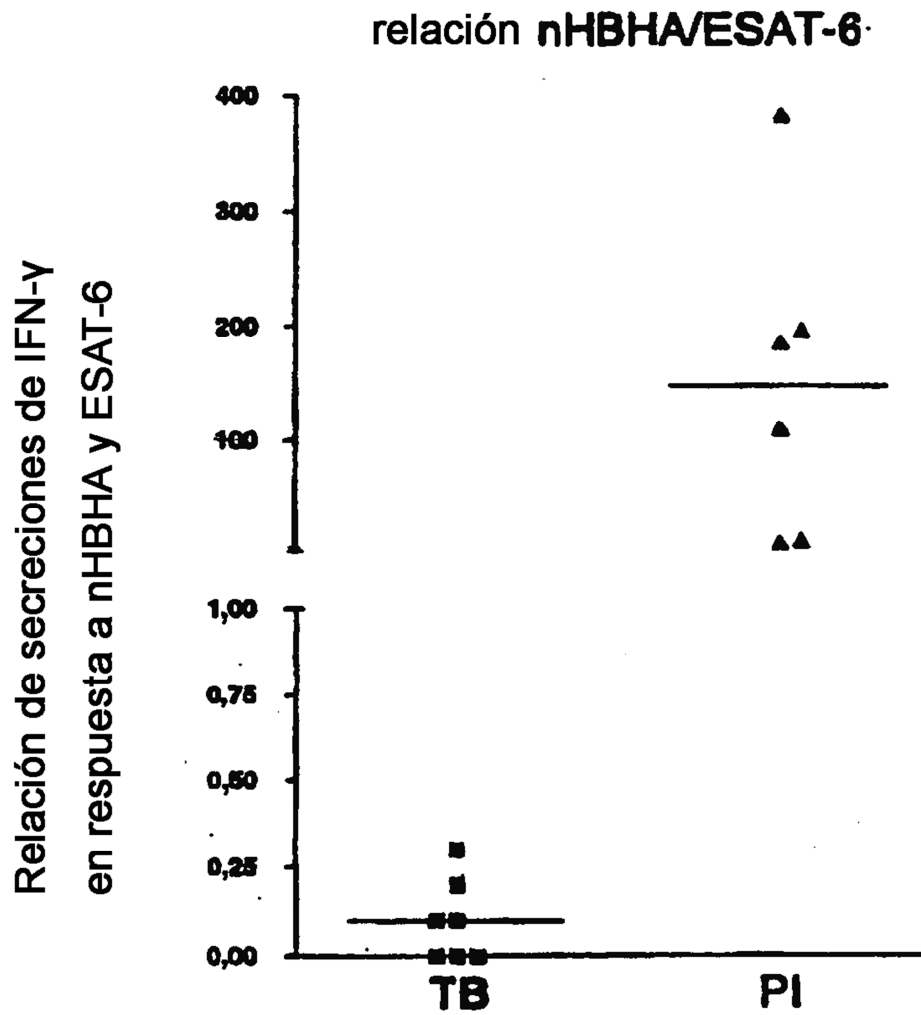


Fig 6

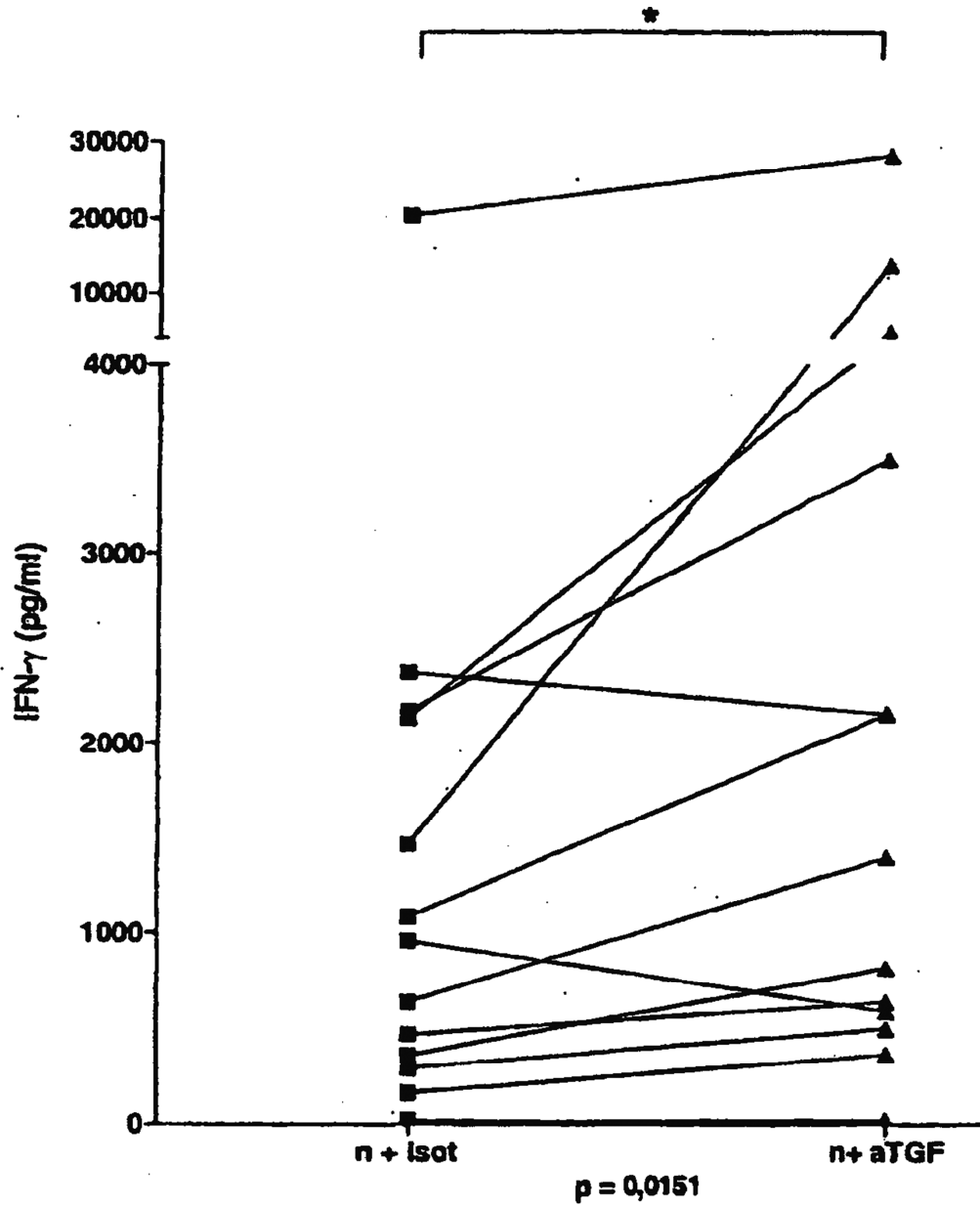


Fig. 7

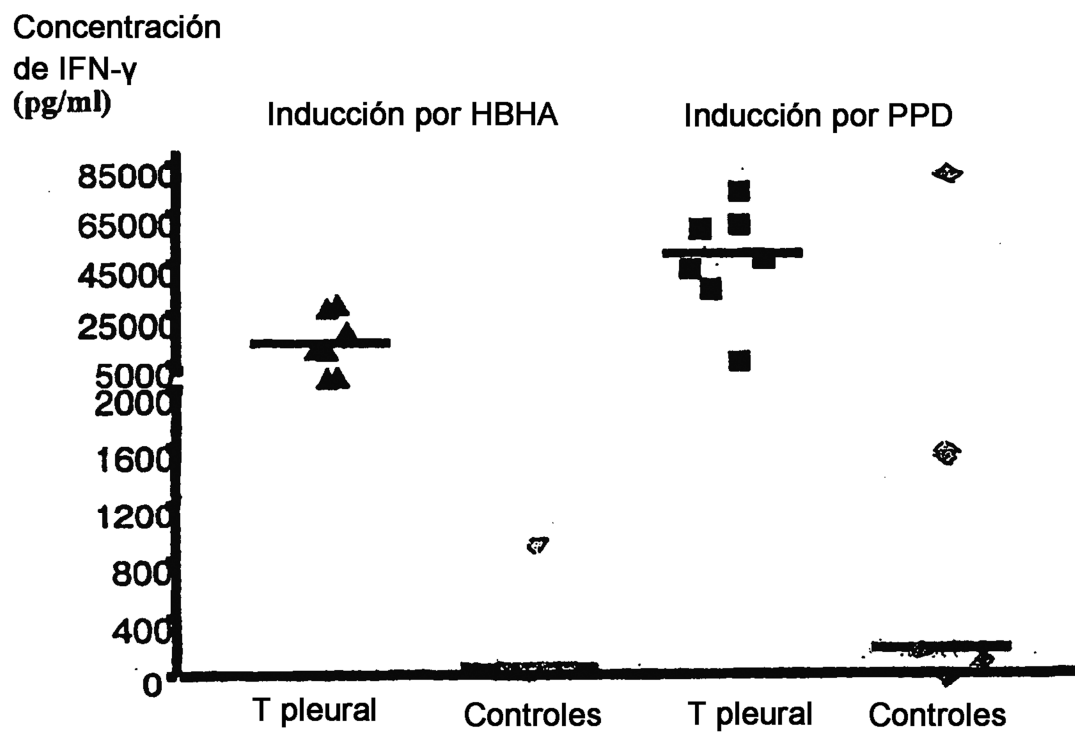


Fig. 8

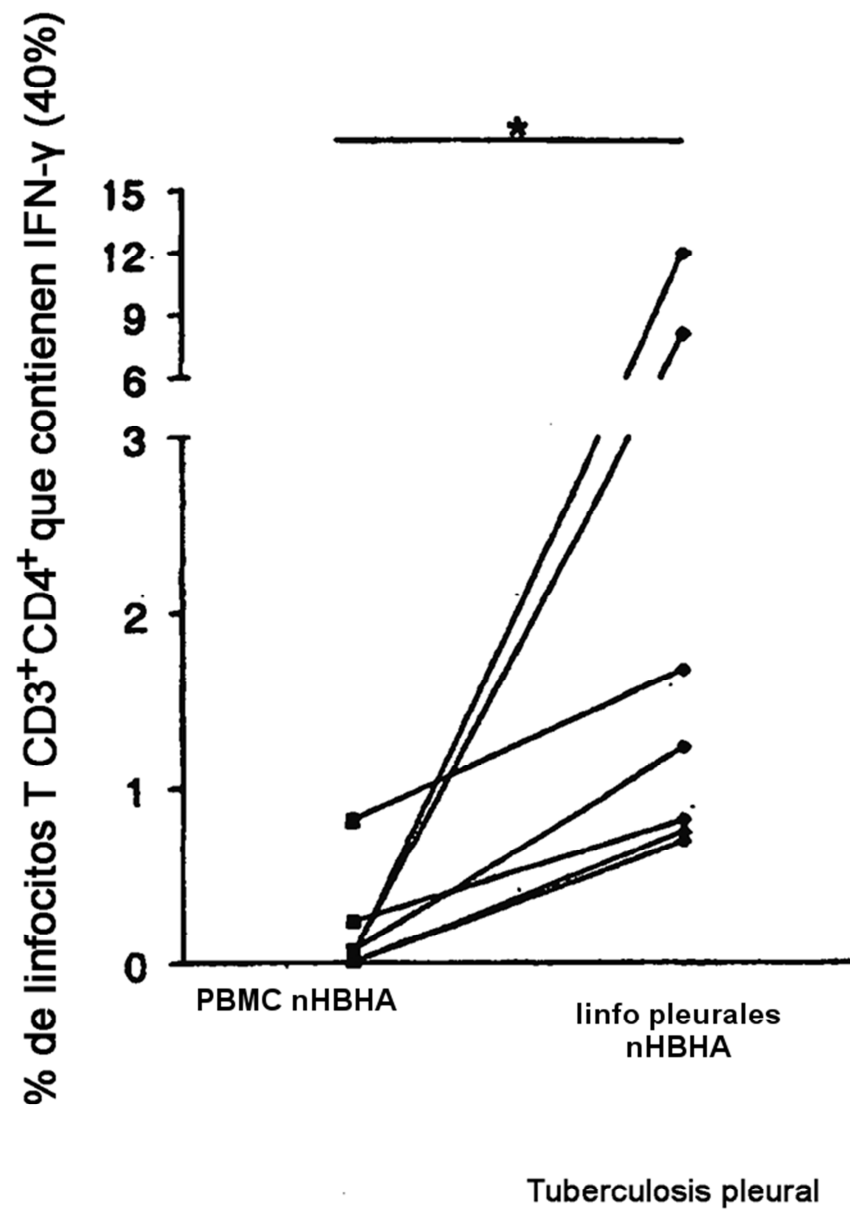


Fig. 9

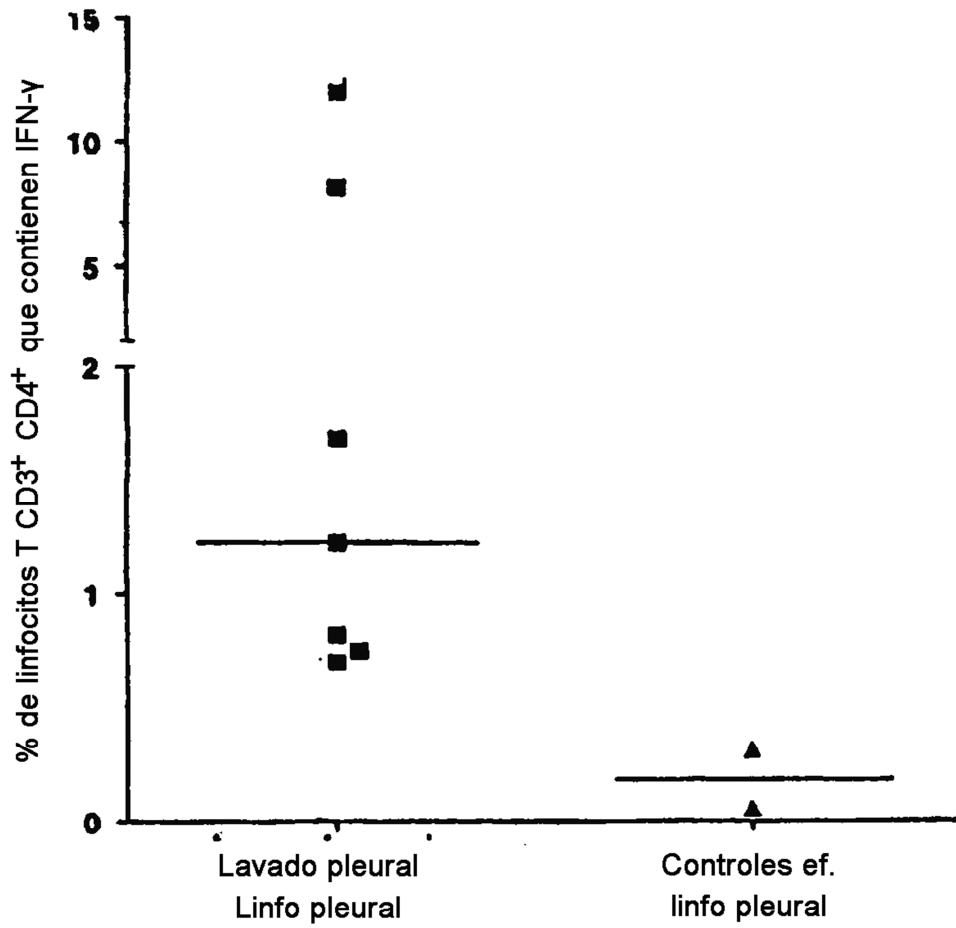


Fig. 10

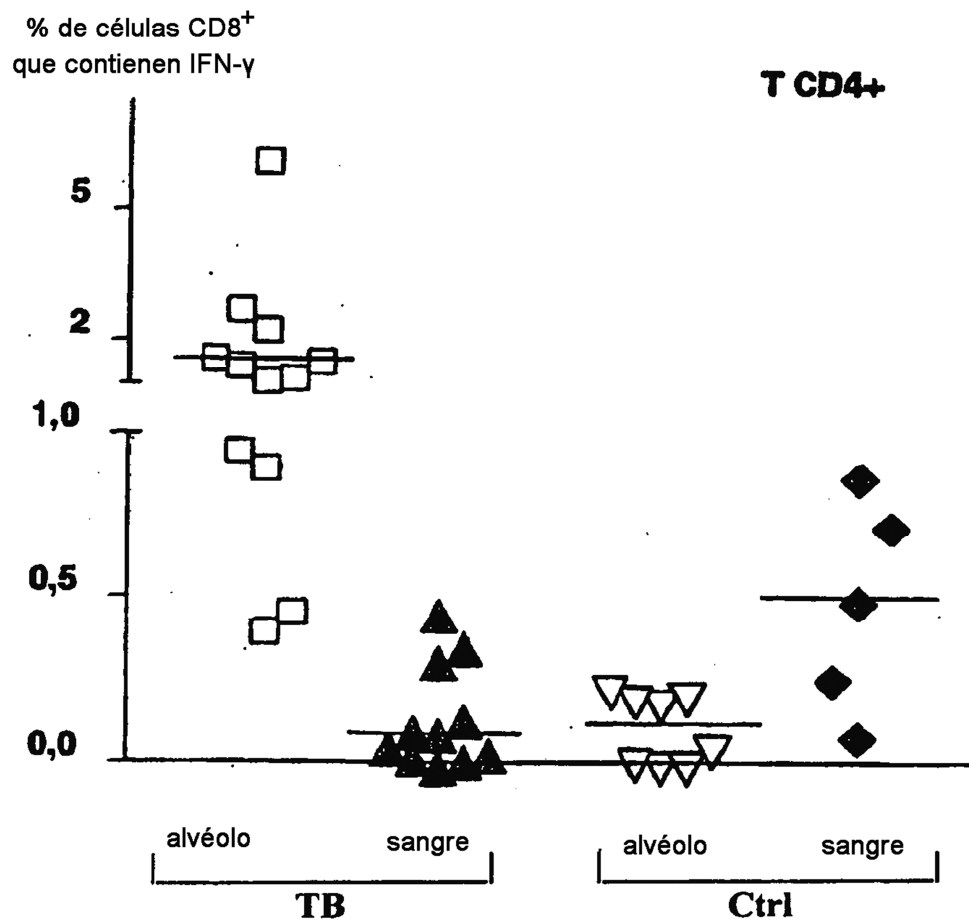


Fig. 11A

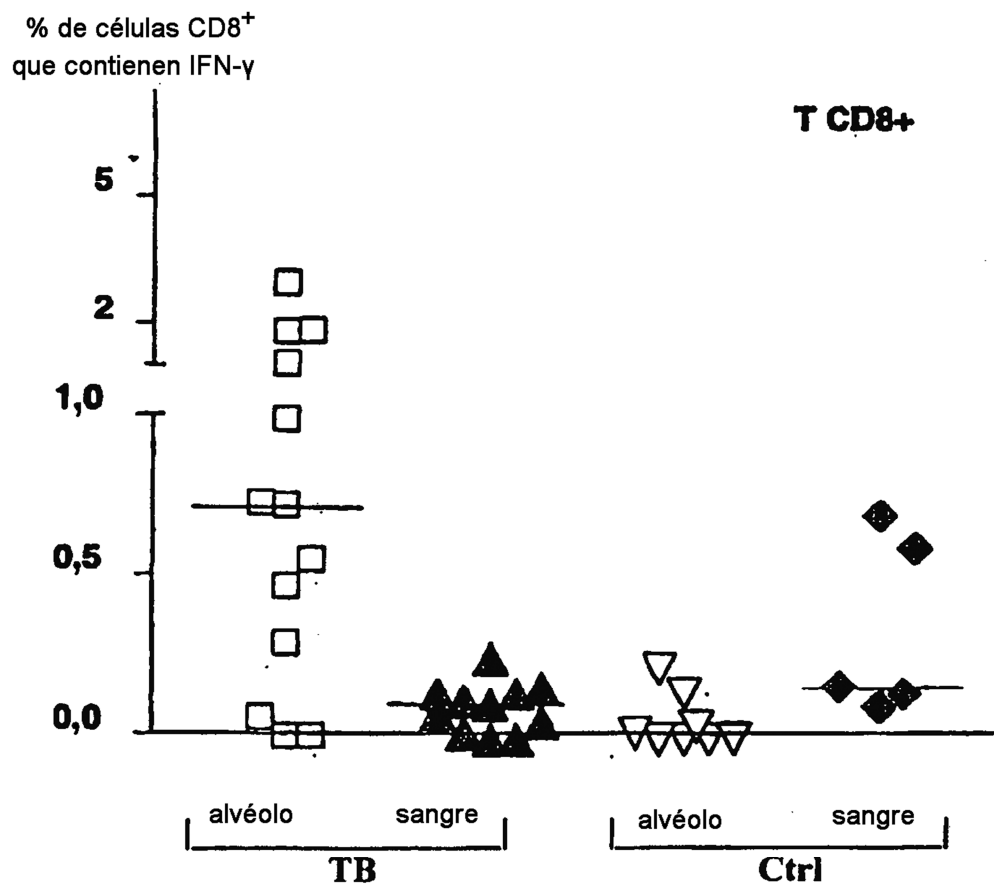
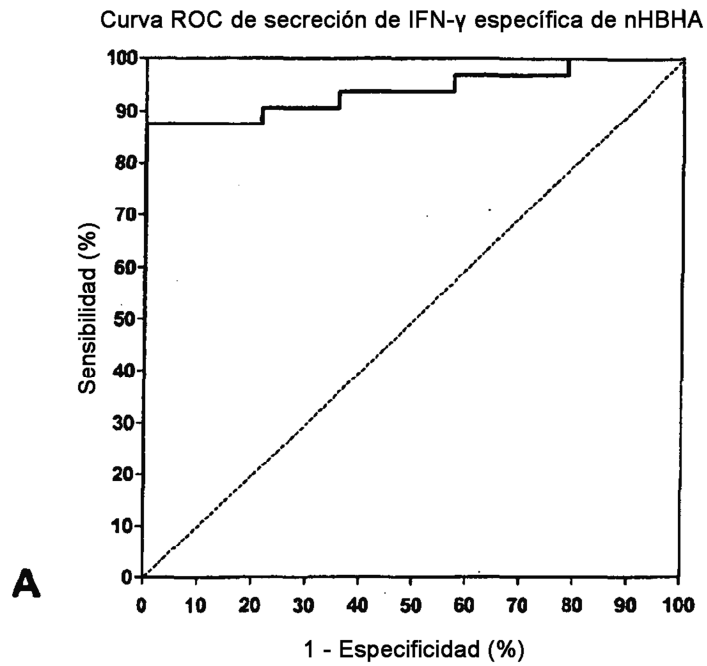
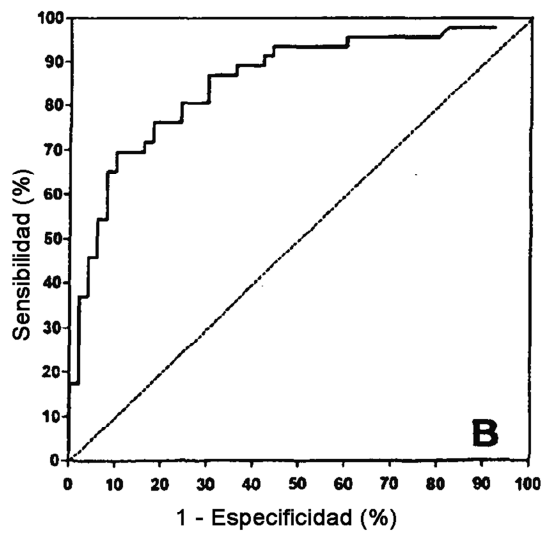


Fig. 11B



Curva ROC de secreción de IFN- γ específica de nHBHA



Curva ROC de secreción de IFN- γ específica de PPd

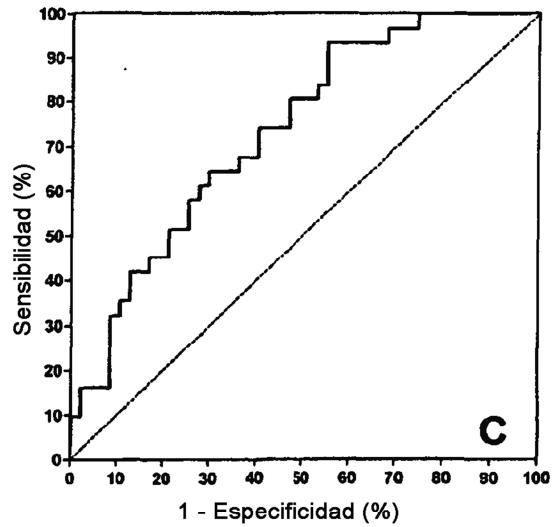


Fig. 12